

**Modulation pulmonaler antigenpräsentierender Zellen nach topischer
Applikation des Toll-like receptor 7 Liganden Imiquimod (Aldara®)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nicole Hagel
aus Magdeburg

Gießen 2014

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Fachbereichs
Medizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Direktor: Prof. Dr.med. G. Bein

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Schmitz

Tag der Disputation: 12.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Einführung.....	1
1.2. Grundlagen.....	2
1.2.1. Dendritische Zellen-Regulatoren des Immunsystems	2
1.2.1.1. Entwicklung und Plastizität	3
1.2.1.2. Antigenaufnahme, Migration und T-Zell Stimulation.....	6
1.2.1.3. Pulmonale DC Subpopulationen	7
1.2.2. Das pulmonale System	8
1.2.3. Toll like Rezeptoren	11
1.2.3.1. Toll like Rezeptor 7	11
1.2.4. TLR-7 Ligand Imiquimod	14
1.3. Fragestellung.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Verbrauchsmaterial	16
2.1.2. Chemikalien.....	17
2.1.3. Antikörper	18
2.1.4. Geräte	19
2.1.5. Statistik.....	20
2.1.6. Computer Software.....	20
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Applikation von Imiquimod (Aldara®).....	21
2.2.2. Isolation der Zellen	21
2.2.3. Färbung der Zellen	22
2.2.3.1. Extrazellulär.....	23
2.2.3.2. Intrazellulär	23
2.2.3.3. Zellzahlbestimmung.....	23
2.2.4. Die Durchflusszytometrie.....	24
2.2.4.1. Kompensation.....	26
2.2.4.2. Applikationseinstellung	27
2.2.5. Magnetische Zellseparation (MACS)	27
2.2.6. Zellstimulation und Zellkultur	28
2.2.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay)	28
2.2.8. Pathologie	30

3. Ergebnisse.....	31
3.1. Pulmonale Veränderungen des Immunstatus nach topischer Applikation des TLR-7 Liganden Aldara®	31
3.1.1. Identifikation der pulmonalen DC Subpopulationen und respiratorischer Makrophagen	31
3.1.2. Topische Stimulation des TLR-7 erhöht die absoluten und relativen respiratorischen DCs im Gegensatz zu Makrophagen und Granulozyten	33
3.1.3. Monozytäre DCs und CD11b ^{high} DCs repräsentieren den Hauptanteil der respiratorischen DC Subpopulation nach topischer TLR-7 Stimulation.....	35
3.1.4. Reduktion der respiratorischen B Lymphozyten und Anstieg respiratorischer Natürlicher Killer Zellen nach Stimulation der Haut mit Imiquimod	37
3.1.5. Topische TLR-7 Aktivierung beeinflusst Zytokin Produktion respiratorischer Leukozyten.....	43
3.1.6. Modulation der respiratorischen Leukozyten nach TLR-7 Stimulation ist verknüpft mit den Veränderungen im peripheren Blut.....	45
3.1.7. Topische TLR-7 Stimulation bewirkt keine bronchoalveoläre Inflammation	47
4. Diskussion.....	49
4.1. Veränderung der respiratorischen Leukozyten ohne Zeichen einer pulmonalen Entzündung nach TLR-7 Hautstimulation.....	49
4.2. Neue Methode zur Beeinflussung des Immunstatus der Lunge: Stimulation des TLR-7 über die Haut.....	50
4.3. Bestätigung und Vertiefung von vorangegangenen TLR-7 Applikations Studien.....	51
4.3.1. Systemische und topische Applikation von TLR-7 erzielt ähnliche Veränderungen im Blut	51
4.3.2. Keine Zeichen einer pulmonalen Destruktion im Vergleich zum lymphatischen Gewebe	51
4.3.3. Zusammensetzung der respiratorischen Leukozyten wird verändert nach Imiquimod Behandlung	52
4.3.4. Veränderung der Zytokinproduktion in der Lunge sowie im Blut nach TLR-7 Stimulation unterstützt die Theorie der systemischen Immunmodulation durch TLR-7 Hautstimulation	55

4.3.4.1. Zusammenspiel von pulmonalen Leukozyten und Zytokinen nach 7 Tagen Behandlung mit 0,12mg Imiquimod Hautstimulation	57
4.4. Experimentelle Verwendung einer hohen Dosis Imiquimod im Vergleich zu klinischen Anwendungen	57
4.5. Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick.....	58
5. Zusammenfassung.....	59
6. Summary.....	60
7. Abkürzungen	61
8. Abbildungsverzeichnis	64
9. Tabellenverzeichnis	66
10. Literaturverzeichnis	67
11. Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen	76
11.1. Originalarbeiten.....	76
11.2. Abstract/Poster	76
12. Erklärung zur Dissertation.....	77
13. Danksagung.....	78

1. Einleitung

1.1. Einführung

Das Immunsystem erkennt pathogene Keime und eliminiert sie, dabei unterscheidet es zwischen körpereigenen und fremden Strukturen. Die erste Verteidigungslinie, um invasive Erreger zu stoppen, bildet das angeborene Immunsystem. Dieses hat sich durch die Evolution des Menschen biologisch immer weiter entwickelt und schützt unsere Spezies durch sofortige Immunreaktion zum Beispiel via Natürliche Killer Zellen (NK Zellen) und der Aktivierung des adaptiven Immunsystems, durch antigenpräsentierende Zellen (APC) [1].

Eine besondere Rolle im Immunsystem übernehmen die *Toll-Like* Rezeptoren (TLRs). Sie erkennen molekulare Muster, die charakteristisch für pathogene Mikroorganismen sind [2]. Diese transmembranen Rezeptoren wurden erst Ende des letzten Jahrtausend entdeckt und eröffneten einen neuen Weg, das Immunsystem zu modulieren und infektiöse Krankheiten und ihre Folgen zu bekämpfen oder zu verhindern [3]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich primär mit dem TLR-7. Dieser Rezeptor moduliert nach Aktivierung, immunkompetente Zellen und ist somit von großem Interesse für gesteuerte Immunmodulation, da chemisch hergestellte Liganden für diesen Rezeptor zur Verfügung stehen. Der TLR-7 ist primär lokalisiert auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs), einer Subpopulation der Dendritischen Zellen (DCs) und B-Zellen [1,3]. Die DCs haben eine Schlüsselfunktion, sie vermitteln zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem [4].

Im Respirationstrakt müssen sich die antigenpräsentierenden Zellen ständig mit Umweltkeimen auseinandersetzen. Die Subpopulationen der respiratorischen DCs definieren sich über die spezifischen Oberflächenmoleküle (CD, *cluster of differentiation*) und übernehmen eine regulierende Rolle. Die CD103⁺ DCs und die CD11b⁺ DCs sind wichtige antigenpräsentierende Zellen aus der Lunge, die zu den drainierenden mediastinalen Lymphknoten abwandern und dort eine T-Zell Antwort auslösen. Das wurde an Versuchen mit Influenza infizierten Mäusen nachgewiesen [5]. Das Influenza Virus besitzt eine einzelsträngige RNA (ssRNA) und ist somit ein natürlicher Ligand vom TLR-7 [6]. Dieser Zusammenhang lässt eine Modulation pulmonaler antigenpräsentierender Zellen durch einen pharmakologischen TLR-7 Agonisten vermuten. Der TLR-7 Ligand Aldara® (5% Imiquimod Creme) wird schon erfolgreich topisch angewendet, um Feigwarzen, oberflächliche Basalzellkarzinome und aktinische Keratosen zu behandeln [7]. Der antivirale und antitumorale Effekt beruht zum Teil auf einer lokalen Interferon-alpha (IFN-α) Produktion, durch die es zu

einer Stimulation des Immunsystems kommt [8]. Durch systemische Applikation des TLR-7 und TLR-8 Agonisten Resiquimod (R-848) konnten schon verschiedene Reaktionen des Immunsystems bewiesen werden. Bei Mäusen, die mit R-848 behandelt wurden, reduzierten sich die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen der zirkulierenden Leukozyten [9,10]. In Milzzellen kommt es zu einer vermehrten Expression des Aktivierungsmarkers CD69⁺. Durch Veränderung der Mikroarchitektur der Milz und Zunahme von Makrophagen (Mph), dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten (NG) kann es zu einer Splenomegalie während der Behandlung mit R-848 kommen [9].

Die systemische antivirale Wirkung durch Injektion oder orale Einnahme von TLR-7 Agonisten konnte auch an Hepatitis C infizierten Menschen gezeigt werden. Es kommt zu einer Reduktion der Hepatitis C Viren (HCV) mRNA. Diese Studien mussten jedoch unterbrochen werden, da es zu starken Nebenwirkungen bis hin zu toxischen Reaktionen kam [8].

Da die lokale Behandlung der Lunge schwierig ist, müssen Strategien entwickelt werden um das Medikament pulmonal zu platzieren. Eine davon ist die intranasale Applikation mit R-848. Dadurch steigt intrapulmonal die Konzentration von IFN- α in den innatens Immunzellen (aus der bronchoalveoläre Lavage (BAL)) [4]. Durch IFN- α Produktion kommt es zu einer raschen Suppression der T-Helfer 2 (TH2) Zellen Aktivität in den mediastinalen Lymphknoten (MLN) und somit zur Unterdrückung einer akuten allergischen Antwort. Eine langanhaltende Immunmodulation wird durch R-848 über eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und Interferon-gamma (IFN- γ) reguliert [4].

1.2. Grundlagen

1.2.1. Dendritische Zellen-Regulatoren des Immunsystems

Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen steuern das angeborene und adaptive Immunsystem, um auf eine Invasion durch pathogene Keime eine adäquate Verteidigungsstrategie zu entwickeln. Durch die Fähigkeit Antigene aufzunehmen, Lymphozyten co-stimulierende Moleküle zu exprimieren und immunmodulierende Zytokine zu sezernieren, können sie effektiv B- oder T- Lymphozyten aktivieren [11]. Pathogen assoziierte molekulare Muster (*Pathogen associated molecular patterns*/PAMPs) sind Moleküle, die charakteristisch für pathologische Mikroorganismen sind. PAMPs werden von Muster-Erkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition receptors*/PRRs) erfasst und setzen dadurch eine Immunantwortkaskade in Bewegung [12]. Zu den PRRs gehören auch die TLRs auf den DCs. Am Beispiel des

Masern-Virus wird deutlich wie wichtig diese Zellen für das Immunsystem sind. Das Virus reduziert die CD40L abhängige Ausreifung der DCs, das kann zu einer Immunsuppression führen [13]. Dadurch folgen Sekundärinfektionen (z.B.: Masernpneumonie), die vor allem in der dritten Welt eine Ursache für Mortalität sind [14]. Somit ist ein Mangel an reifen DCs Ursache für eine Störung im Immunsystem. Dadurch können pathogene Keime nicht mehr adäquat abgewehrt werden.

Als antigenpräsentierende Zellen sind die DCs auch an der Toleranzentwicklung gegenüber körpereigenen Antigenen beteiligt. Im Thymus induzieren sie Apoptose bei T-Zellen, die gegen eigene Proteine aktiv werden und minimieren dadurch Autoimmunreaktionen [15]. In der Peripherie steuern DCs das Überleben der T Zelle und aktivieren die T Regulator Zellen (Treg) [16].

DCs haben somit eine wichtige Aufgabe, denn ihr Aktivitätszustand ist entscheidend für die Abwehr von Krankheitserregern. Dadurch ist es nicht verwunderlich, dass diese besonderen Zellen des Immunsystems im Rampenlicht der Forschung stehen. Sie bieten verschiedene Ansatzpunkte, um in Zukunft ein breites Band an Krankheiten zu bekämpfen. Aldara, das über den TLR-7 DCs aktiviert und eine antivirale sowie antitumorale Wirkung hat, wird erfolgreich gegen virusinduzierte externe Hautläsionen und Hautkrebsarten angewandt [8].

1.2.1.1. Entwicklung und Plastizität

Die phänotypisch unreifen DCs (imDCs, *immature dendritic cells*) werden kontinuierlich vom Knochenmark produziert. Der *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) Ligand und der *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) induzieren DC Wachstum und Differenzierung [17]. Für die Entwicklung der DC Subpopulationen werden zwei unterschiedliche Modelle diskutiert [15,18]. DCs können aus einer gemeinsamen Vorläuferzelllinie entstehen. Dies konnte in vitro durch Isolation muriner DC Vorläufer Zellen gezeigt werden [16]. Diskutiert wird aber auch die Entwicklung durch zwei getrennte Vorläuferzelllinien, der myeloiden und der lymphatischen (Abbildung 1). So gibt es DC Subpopulationen (z.B.: pDCs) die Oberflächenmarker besitzen, welche typisch für lymphoide Zellen sind (CD4 und CD8) [15,19].

Die unterschiedliche Entwicklung der DC Subpopulationen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen ist durch funktionale Plastizität geprägt. Sie wird moduliert durch Zytokine (Abbildung 1.a.), der Rezeptor-Kaskade nach Antigenkontakt (Abbildung 1.b.), dem Entwicklungsstadium und der Lokalisation [18]. Dadurch kommt es zu unterschiedlicher Funktionalität der Subpopulationen, die sich durch Oberflächenmarker differenzieren lassen. Zum Beispiel wandern die CD11c⁺CD1a⁺

unreifen DCs (imDCs) in die Epidermis und werden zu Langerhans Zellen (LHZ), während die $CD11c^+CD1a^-$ DCs in das Körpergewebe gelangen und sich zu interstitiellen imDCs differenzieren. Diese imDCs können im Gegensatz zu den LHZ große Mengen Antigen (AG) über den Mannose Rezeptor aufnehmen und Interleukin 10 (IL-10) produzieren, dieses wiederum kann B Lymphozyten und Antikörperproduktion beeinflussen [11].

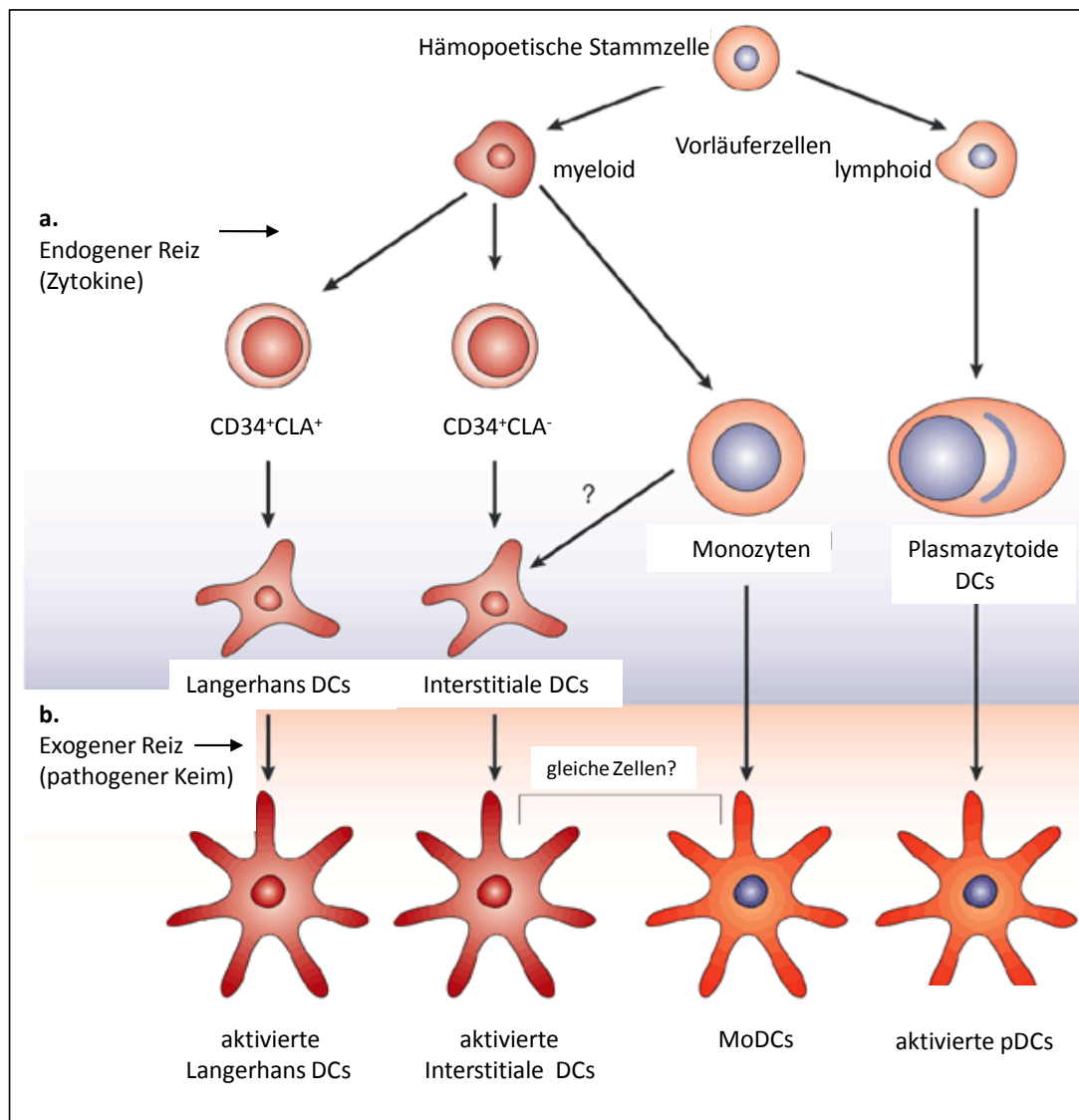


Abbildung 1: Entstehung der DCs aus hämopoetischen Stammzellen (modifiziert durch veränderte Beschriftung der pDCs und MoDCs nach Shortman et al. 2002 [15]).

Darstellung der lymphoiden und myeloiden DC Entwicklung. a. endogene Reize führen zur Entwicklung von reifen aber ruhenden Zellen, die einen externen Stimulus (b.) für die Aktivierung benötigen.

Bei der Abwehr von pathologischen Keimen, aber auch bei der Toleranz gegenüber körpereigener Antigene, übernehmen die DCs durch ihre verschiedenen Funktionen eine entscheidende Rolle. Sie verknüpfen das angeborene und erworbene Immunsystem und bewältigen diese Aufgabe durch unterschiedliche DC Subpopulationen und funktionale Plastizität. Im gesunden Organismus gibt es im lymphatischen Gewebe mindestens fünf DC Subtypen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Murine DC Subpopulationen, prozentuale Aufteilung im lymphatischen Gewebe (eigene Darstellung in Bezug auf die Tabelle von Shortman et al. 2002 [15]).

DC Subtypen % der DCs in	Lymphoide DCs CD4 ⁺ CD8 ^{high} CD205 ^{high} CD11b ⁻	myeloide DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	myeloide DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	myeloide DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺	Langerhans DCs CD4 ⁺ CD8 ^{low} CD205 ^{high} CD11b ⁺
Milz	23	56	19	<4	<1
Thymus	70				
Mesenteriale LK	19	4	37	26	<4
Haut LK	17	4	17	20	33

Die Oberflächenmoleküle dienen zur Identifizierung der Subpopulationen der DCs. Dadurch konnten verschiedene DC Typen spezifischen Organen zugeordnet werden. Zum Beispiel kommen die CD4⁺CD8⁻CD205⁺CD11b⁺ DCs fast nur in Lymphknoten vor, die ihn über das lymphatische System erreichen. Dabei handelt es sich um gereifte interstitielle DCs. In den Lymphknoten der Haut sind primär CD4⁺CD8^{low}CD205^{high}CD11b⁺ DCs. Sie exprimieren viel Langerin auf ihrer Oberfläche und lassen sich somit als ausgereifte LHZ definieren [15].

Da die Funktionalität der DCs auch von der Lokalisation abhängig ist, ist die Zusammensetzung der DC Subpopulationen vor allem pulmonal von Bedeutung (siehe unter pulmonale DC Subpopulationen).

1.2.1.2. Antigenaufnahme, Migration und T-Zell Stimulation

ImDCs zirkulieren im Blut, in sekundären lymphatischen Organen und warten im peripheren Gewebe, um pathologische Keime aufzunehmen und über Peptid bindende Proteine wie *Histocompatibility complex II* (MHC-II) das Antigen anderen Immunzellen zu präsentieren [20]. *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) werden unter anderen durch TLRs erkannt, wodurch es zu einer Aktivierung des Reifungsprozesses der imDCs kommt und es werden dadurch vermehrt Chemokinrezeptoren für die Migration, MHC-II und T-Zell Co-stimulierende Moleküle für die Aktivierung des Immunsystems auf der Zelloberfläche exprimiert [11,21]. Durch den Chemokinrezeptor CCR7 folgt die antigenpräsentierende Zelle seinem Liganden CCL21 (CC Chemokin Ligand 21, 6CKine) in das lymphatische System [22]. Durch einen zweiten CCR7 Agonisten, das MIP-3 β (*macrophage inflammatory protein-3- β* , CCL19), folgt die Zelle dem Chemokingefälle bis zu den drainierenden Lymphknoten [11]. In diesem sekundären lymphatischen Organ werden naive CD4⁺ T-Zellen aktiviert, die sich zu TH1 oder TH2 Zellen entwickeln. Dieser Entscheidungspfad wird durch sezernierende Zytokine und stimulierende Ko-Faktoren bestimmt [23]. Durch IL-12 produzierende DCs (CD8⁺) kommt es zur Entwicklung einer IFN- γ , IL-2, TNF- α und TNF- β sezernierenden TH1 Zelle [24]. TH1 Zellen unterstützen die Vernichtung intrazellulärer Keime durch Aktivierung von Makrophagen (Mph), B-Zellen Antikörperproduktion (opsonierung) und T-Zell Proliferation (TH2 Zellen werden gehemmt). Durch IL-4 und CD8⁻ DCs kommt es zu einer TH2 Zell Stimulation, mit IL-4, IL-5 und IL-10 Produktion [25]. Dies führt zu einer Elimination extrazellulärer Keime durch vermehrte Antikörper Bildung (z.B.: IgE) und Hemmung der TH1-Zellen [24,25]. Für die spezifische Antigen Erkennung des T-Zell-Rezeptors (TCR) von Zytotoxischer T-Zellen (Tzyt), muss ein MHC-I-Antigenkomplexe über DCs präsentiert werden. Das ist die Aufgabe von nicht infizierten DCs durch Kreuzpräsentation. Die in den Lymphknoten (LK) eingewanderten Zellen aus dem peripheren Gewebe, übertragen Antigene an LK residente DCs, die anschließend die naiven Zellen zu Tzyt Zellen aktivieren, um infizierte Zellen sofort zu töten [26]. Aus dem Blut rekrutierte CD8 α ⁺ DCs sind die primären APCs für CD8⁺ T-Zell Aktivierung bei Influenza Infektion [26]. Ein antiviraler Zustand eines Zellkomplexes entsteht unter anderem durch die Sezernierung von Interferon Typ I (IFN-I). DCs, vor allem pDCs produzieren IFN- α , dadurch entstehen antivirale Effektoren wie Mx GTPase, PKR (*RNA-dependent protein kinase*), RNase L und ISG (*interferon-stimulated gene*) die eine virale Replikation hemmen [27,28]. Im innaten Immunsystem unterstützt IFN- α auch die DC Entwicklung, die B-Zell Aktivierung und die Gedächtnis CD8⁺ T-Zell Proliferation [28]. TLR können durch ein positives *Feedback* via IFN- α Ihre

Aktivität verstärken [29]. Die DCs sind wichtig für die Stimulation und Vernetzung von Immunzellen. Dafür müssen sie die Fähigkeit besitzen, verschieden Gewebe durch Adhäsion zu passieren oder einem Chemokingefälle zu folgen. Zirkulierende DCs gelangen aus dem Blut über die Bindung an Endothelzellen in die peripheren Organe [30]. Während aus einem entzündeten Gewebe, zum Beispiel der Lunge reife CCR7 reiche DCs, entlang eines CCL21 Chemokingefälles in die Lymphbahn wandern [31]. Von dort aus gelangen sie in den Lymphknoten oder über die Venenwinkel in das Blut, von wo aus sie zum Thymus oder zur Milz gelangen.

1.2.1.3. Pulmonale DC Subpopulationen

Im gesunden Respirationstrakt (RT) wurden verschiedene DC Subpopulationen durch Zelloberflächenmarker definiert. Sie unterscheiden sich funktionell und sind in verschiedenen Kompartimenten der Lunge lokalisiert [32].

Die respiratorischen DCs (*respiratory dendritic cells*, RDC) bilden entlang der großen und kleinen Luftwege mit ihren Fortsätzen ein Netz am Epithelgewebe und sind in der Mucosa, im Lungengewebe sowie partiell im ventilierten Areal lokalisiert [5,33].

Mittels Durchflusszytometrie konnten pulmonal bisher mindestens 4 RDC Populationen aus der CD11c⁺SiglecF⁻ Population, durch spezifische Oberflächenmarker und der Ausprägung von MHC II definiert werden [5].

Tabelle 2: Pulmonale DC Subpopulationen (eigene Darstellung im Bezug auf Kim et al. 2009 [5]).

Die pDCs werden durch den typischen Marker B220 definiert. Die CD103 positiven DCs werden über einen hohen Anteil von MHCII und wenig CD11b definiert. CD103 negative DCs werden in zwei Subtypen unterteilt. Die MoRDCs, die wenig MHCII exprimieren und die CD11b^{high} DCs die auf ihrer Oberfläche viel MHCII und CD11b präsentieren.

pulmonale DC Subpopulationen	Definition
pDC	B220 ⁺ Gr-1 ⁺ MHC II ^{low}
CD103 ⁺	CD103 ⁺ MHC II ^{high} CD11b ^{neg-high}
CD11b ^{high}	CD103 ⁻ MHC II ^{high} CD11b ^{med-high}
MoRDC	CD103 ⁻ MHC II ^{neg-med} CD11b ^{high}

CD103⁺ ist ein α E Integrin, das mit β 7 den E-cadherin Ligand formt und in der Mucosa lokalisiert ist. Das E-cadherin wird von bronchialen Epithelzellen exprimiert und kann dadurch mit CD103⁺ DCs kommunizieren [33].

Im Gegensatz dazu sind CD103⁻ DCs in der Submucosa und im Lungenparenchym enthalten. Die primären viralen antigenpräsentierenden Subtypen sind CD11b^{high} und CD103⁺ DCs, die aus der Lunge in die drainierenden mediastinalen Lymphknoten (DML) wandern und dort T- Zellen stimulieren. Beide Subtypen können eine CD4 T-Zellantwort induzieren, aber nur CD103⁺ pulmonale DCs aktivieren CD8 T-Zellen effektiv zur Proliferation und für zytotoxische Effekte. Die Migration ist durch CCR7 Expression gesteuert (wie vorangehend beschrieben) [5].

MoDCs (Monozytäre Dendritische Zellen) können aus Monozyten entstehen, wenn diese nicht vorher durch pathogene oder TLR Liganden aktiviert wurden. Im Organ Haut übernehmen sie die CD8⁺ T-Zellen Kreuzpräsentation, während MoRDC in der Lunge eine entscheidende Rolle bei der viralen Pneumonie spielen [34,35,36]. Aktivierte pDC kontrollieren die Monozytenmigration in die Lunge, durch Suppression von pulmonaler MCP-1 Produktion [37,38]. Der MCP-1 Rezeptor befindet sich auf den Monozyten, die pulmonal eine Entzündung unterstützen würden. Unreife pDC haben ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung, da sie wenig MHC II und co-stimulierende Moleküle exprimieren [38]. Der PD-L1, welcher zur B7 hemmenden Familie gehört, ist erhöht auf pDCs und hemmt die T-Zell Aktivierung über PD-1 [39]. Die zirkulierenden pDCs gelangen vom Blut in die Lymphknoten, wenn die *high endothelial venules* (HEV) inflammationsabhängige Adhäsionsmoleküle exprimieren und Zytokine sezernieren [40]. Im LK unterstützen pDC die residenten DCs bei der CD8 T-Zell Stimulation und sezernieren T-Zell anlockende Chemokine [41].

1.2.2. Das pulmonale System

Die Lunge ist ein vielseitiges, unverzichtbares Organ des menschlichen Organismus. Die primäre Aufgabe ist der Sauerstoffaustausch und somit die Sicherung der aeroben Energiegewinnung. Kurz gesagt ist somit ein Leben ohne funktionsfähige Lunge nicht möglich.

450 Millionen Fälle von Pneumonie werden laut WHO (*World Health Organization*) jedes Jahr registriert und vier Millionen versterben jährlich daran. In der Pädiatrie und Geriatrie ist die Sterblichkeit auf Grund einer Lungenentzündung deutlich erhöht [42].

Die Schleimhaut des Respirationstrakts ist ständig mit der äußeren Umwelt in Kontakt und bietet somit Viren, Bakterien und Pilzen eine Pforte zur Invasion des Organismus.

Ein besonderer immunologischer Schutzmechanismus hat sich deshalb Jahrtausende lang entwickelt, um Infektionen zu verhindern [43].

Dieser reicht aber oft nicht aus und somit kommt es zu pulmonalen Erkrankungen durch pathogene Keime. Virale Infektionen entstehen nach Einatmung von infektiösem Aerosol und breiten sich über den Nasopharynx, die Bronchien bis in die Alveolen aus. Die häufigste Komplikation ist eine sekundäre bakterielle Infektion, die sich durch die viral beschädigte Mucosa pulmonal leichter manifestieren kann [44].

Die Homöostase der gesunden Lunge unterliegt primär der Suppression von unnötigen Immunantworten. Eine Aktivierung des innate und adaptiven Immunsystems durch nicht pathogene Partikel, wird unterdrückt um pulmonale Hyperreaktivität zu verhindern. Dieser Mechanismus wird vor allem durch intraluminale Zellen, die direkten Kontakt zu äußeren Umweltpartikeln haben, wie alveoläre Mph, γ/δ Zellen, DCs und Epithelzellen gesteuert [45]. Das Surfactant Protein A (SP-A) und SP-D wird von Pneumozyten Typ 2 produziert und reduziert die Phagozytose Aktivität der Mph (Abbildung 2a). Des Weiteren bindet SP-A an TLRs und verhindert dadurch die Interaktion mit ihren pro-inflammatorischen Liganden [46]. Die Epithelzellen sind mit anderen pulmonalen Zellen in Kontakt und können diese direkt oder indirekt beeinflussen. Sie hemmen alveolare Mph Aktivität anhand IL-10 und TGF β Produktion, sowie CD200 und mucine-like Glykoprotein (MUC1) Expression (Abbildung 2b) [45]. Der Oberflächenmarker CD200 reduziert die Aktivität der Immunzellen und ist ebenfalls auf den Endothelzellen in der nicht infizierten Lunge zu finden (Abbildung 2c) [45].

Das respiratorische Epithel moduliert auch die Funktionalität der pulmonalen DCs (Abbildung 2d) durch Sezernierung von GM-CSF, TGF β und Stickstoff (NO) [47]. TGF β hemmt die Reifung der DCs und NO inaktiviert die Fähigkeit zur Antigenpräsentation mit der Folge, dass T-Zellen nicht aktiviert werden. Alveoläre Makrophagen modulieren ebenfalls die DCs durch die Ausschüttung von NO und können die adaptive Immunantwort durch direkte Hemmung der T-Zellen mittels TGF β supprimieren [48]. Die Fibroblasten in der Lunge übernehmen Reparaturaufgaben und sezernieren Prostaglandin E₂. Das hemmt die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten (Abbildung 2e) [45].

Die Empfindlichkeit gegenüber Endotoxine ist bei den Zellen des unteren RT herabgesetzt, nur größere Mengen pathologischer Proteine lösen eine Immunreaktion aus [49]. Bei einer viralen Infektion werden, zum Beispiel durch den Influenza Virus, innate und adaptive Leukozyten in die Lunge rekrutiert. Die Tzyt Zellen und NK Zellen zerstören infizierte Zellen, um den pathogenen Keim zu eliminieren, dabei gehen primär pulmonale Epithelzellen zu Grunde [50]. Der Epithelzellverband wird dadurch zerstört und die negativen Regulatorsignale werden nicht mehr gesendet. Die

Inflammation verläuft daraufhin progredient und die Eindämmung ist somit erschwert. Das pulmonale System ist nach einer influenza Infektion in einem Zustand der Inaktivität, welcher durch verminderte Fähigkeiten des innaten Immunsystems, auf pathogene Keime zu reagieren, gekennzeichnet ist [51,52]. Dadurch können sich sekundär, Antigene wie *Staphylococcus pneumoniae*, *S. aureus* oder *Haemophilus influenza*, in einem post viralen pulmonalen Gewebe ausbreiten und Superinfektionen verursachen [45]. Diese Superinfektionen sind durch zunehmende Antibiotika-Resistenzen immer schwieriger zu behandeln. Dem entsprechend ist es erforderlich, neue Methoden für die Therapie der Pneumonie zu entwickeln [53].

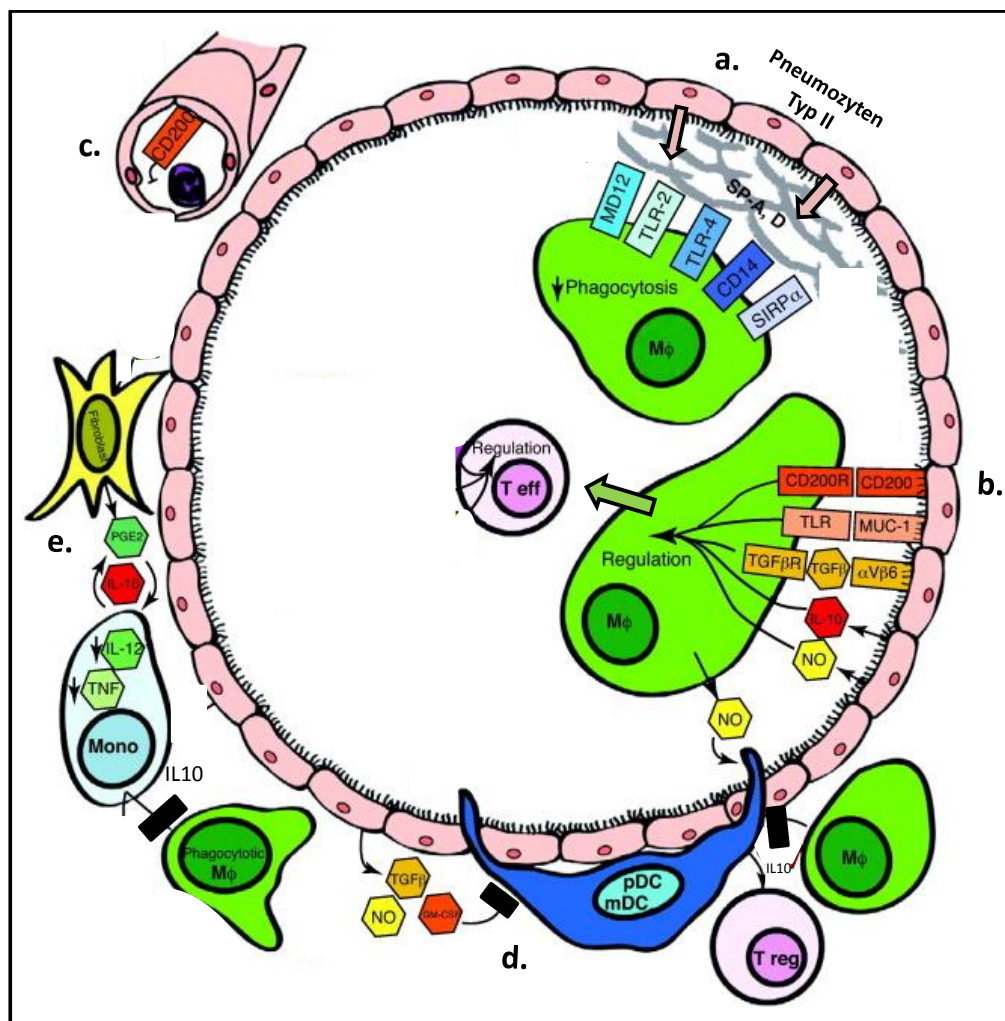


Abbildung 2: Die Immunologische Homeostase im unteren Respirationstrakt (Modifizierte Graphik von Snelgrove et al. 2011 [45], es wurden die wesentlichen Bestandteile hervorgehoben und nicht relevantes entfernt.).

a. Pneumozyten Typ II sezernieren SP-A und D, dadurch kommt es zur Hemmung der Mph. b. Epithelzellen hemmen direkt und indirekt Mph. c. CD200 wird auf der Oberfläche des Endothels gebildet und reduziert die Aktivität von Immunzellen bei gesunder Lunge. d. DCs werden durch Ausschüttung von Botenstoffen aus den Mph und Pneumozyten moduliert. e. Fibroblasten fördern über Prostaglandin E2 die IL-10 Produktion der Monozyten, welches die Mph hemmt.

1.2.3. Toll like Rezeptoren

Die Geschichte der TLR begann mit der Entdeckung von Toll Rezeptoren in der *Drosophila melanogaster* [54]. Der Toll Rezeptor kontrolliert in der Fruchtfliege die Transkription von dem antifungalen Peptid Drosomycin und ist somit bei Pilzinfektionen überlebenswichtig [55]. Die Entdeckung eines humanen homologes zum Toll Rezeptors und seiner Funktion als Immunsystemaktivator nach pathogen Kontakt eröffnete einen neuen Forschungsbereich [56]. Bis zum heutigen Tag wurden 13 murine und 10 humane TLR Gene identifiziert [57].

Diese Rezeptoren gehören zur Familie der PRRs und erkennen verschiedene pathogene Aminosäuresequenzen von bakteriellen Zellwandbestandteilen bis hin zu Nukleinsäuren. Einige wirken als Zelloberflächenrezeptor, während andere in den endosomalen Membranen lokalisiert sind und dort pathogene Bestandteile, die durch Pinozytose in die Zelle gelangt sind, erkennen. Sie sind primär auf Zellen des innate Immunsystems wie Mph, DCs, Monozyten, NK Zellen, aber auch Epithelzellen und B-Zellen lokalisiert. Die transmembranen Rezeptoren haben eine *leucine rich repeat* (LRR) Domäne im extrazellulären Bereich und eine TIR (*toll-interleucine receptor*) Domäne im intrazellulären Kompartiment (bzw. Intrazellulär/Endosomal). Es gibt 5 TLR Subfamilien die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden [1]. Dies ermöglicht die Erkennung eines breiten Spektrums von Antigenen.

Nach Pathogenkontakt mit der LRR Region ist der weitere Signalweg von der TIR Domäne ausgehend. Verschieden TIR Adaptermoleküle aktivieren unterschiedliche Transkriptionsmechanismen. Das Adaptermolekül MyD88 (*myeloid differentiation marker 88*) induziert inflammatorische Zytokine und wird von allen TLRs aktiviert. Es gibt noch TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*), das den MyD88 Weg unterstützt bei TLR-2 und TLR-4 sowie TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) das MyD88 unabhängig Transkription induziert [2].

1.2.3.1. Toll like Rezeptor 7

Das TLR-7 Gen ist auf Chromosom X lokalisiert. TLR-7 und TLR-8 gehören zur TLR-9 Familie und sind sich strukturell ähnlich [1]. TLR-7 ist in murinen und humanen Zellen aktiv. Der murine TLR-8 schien inaktiv zu sein, neuere Forschungsergebnisse zeigten aber dass der murine TLR-8 den TLR-7 beeinflusst [58,59]. Der TLR-7 ist ein transmembranes Protein und befindet sich im endosomalen Kompartiment, wo er einzelsträngige RNA erkennt und als Sensor der viralen Abwehr fungiert. Der Transfer des Rezeptors vom ER zum Endosomen wird durch das *Poliovirus* Membranprotein

Unc93B1 reguliert [60]. Die genauen Aktivierungsmechanismen sind bis heute noch unklar. Im Kompartiment treffen Ligand und Rezeptor nach Internalisierung des Antigens in das Endosomen (Influenza Virus) oder durch Autophagie (Vesiculärer Stomatitis Virus) aufeinander. Die eigene Nukleinsäure kann auch eine Aktivierung des Rezeptors bewirken und wird darum degradiert. Dadurch wird eine Autoimmunreaktion verhindert [61].

Nach einem Antigenkontakt mit der LRR Region werden durch Konformationsänderungen die TIR Domänen von TLR-7 und MyD88 näher gebracht. Dadurch entsteht ein Komplex von dem verschiedene Signalkaskaden ausgehen (Abbildung 3). TLR-7 ist MyD88 abhängig und induziert in unterschiedlichen Immunzellen differente Gentranskriptionen in verschiedenem Ausmaß [1,62]. Es wird nach Entstehung des Signalkomplexes IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK4) rekrutiert, die IRAK1 aktiviert und dadurch der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR) -assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) mobilisiert. TRAF6 induziert TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1), die einen Komplex bildet mit TAK1-bindenden Protein 1 (TAB1) und TAB2. TAK1 phosphoryliert I κ B Kinase (IKK). Dadurch wird I κ B gehemmt und NF- κ B freigesetzt. NF- κ B transloziert in den Zellkern und reguliert die Transkription von Genabschnitten für proinflammatorische Zytokine wie IL-12, IL-6 und TNF α . Die *Mitogen-activated kinases* (MAPKs) wie Jun Kinasen (JNKs) und p38 werden ebenfalls durch TAK1 phosphoryliert und induzieren wie NF- κ B die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [62].

Die Familie der *Interferon regulatory factors* (IRFs) wird auch über MyD88 aktiviert. Dabei handelt es sich um IRF1, IRF5 und den IFN- α Produzenten IRF7. Der IRF1 hat eine direkte Verbindung zum Adaptermolekül und benötigt es, um in den Kern, vor allem von myeloiden DCs, zu gelangen und IFN- β zu produzieren [63]. IRF5 bindet im Nukleus primär an proinflammatorische Genabschnitte und ist MyD88 sowie TRAF6 abhängig [64].

In pDCs existiert noch ein weiterer Signalweg, der über MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF3, TRAF6, IKK α und Osteopontin zur IRF7 Aktivierung und dadurch zur IFN α Produktion führt [59]. Es ist noch unklar, ob die Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine und der IFN Typ1 Proteine simultan, gestaffelt oder einzeln gefördert wird.

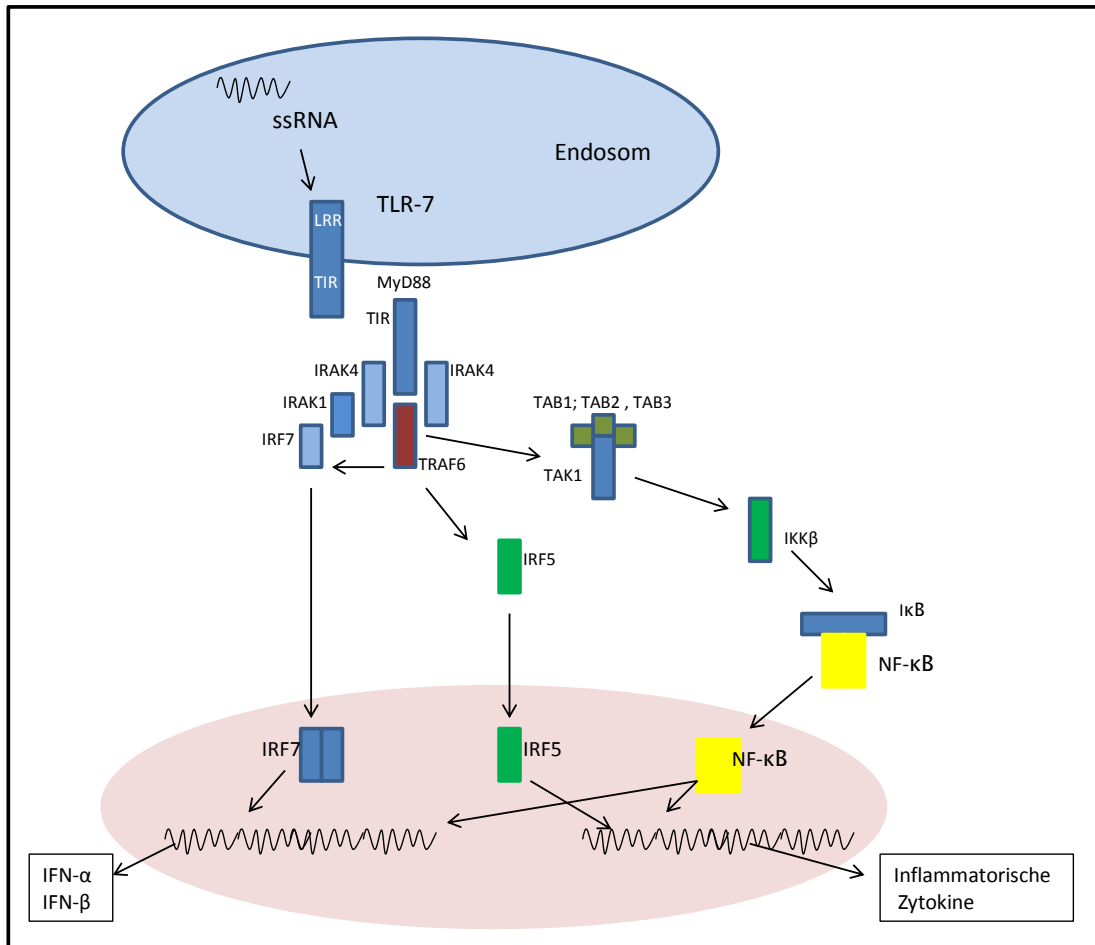


Abbildung 3: Aktivierungsmechanismus und Signalkaskade des TLR-7 Rezeptors (eigene Graphik, im Bezug auf Kawai et al. 2006 [86]). Dargestellt sind die MyD88 abhängigen Kaskaden, welche zur Produktion proinflammatorische Zytokine und Typ I IFN führen.

Der transmembrane Rezeptor der TLR Familie, welcher in verschiedenen Zellen exprimiert wird, führt zur Produktion von Zytokinen und stimuliert Interferon Typ 1 Sezernierung. Der Hauptlokalisationsort des TLR-7 ist in den pDCs, die nach ihrer Aktivierung primär Interferon über Ihre spezielle Signalkaskade (siehe oben) produzieren und antiviral wirken [1,3,65]. Verschiedene DC Subpopulationen exprimieren auch TLR-7, aber nur im geringen Ausmaß, wie zum Beispiel mDCs die IL-12 nach TLR-7 Aktivierung sezernieren und dadurch TH1 Zellen stimulieren [65]. Bei den MoDCs wird IL-27 Sezernierung, nach dem TLR-7 Kontakt mit seinem Liganden hatte, hoch reguliert [66]. Die Bildung verschiedener Zytokine durch TLR-7 Aktivierung scheint abhängig zu sein von der jeweiligen DC Subpopulation.

Von den innaten Immunzellen besitzen eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulocyten und NK Zellen den TLR-7 [67,68,69]. Neutrophile Granulocyten exprimieren inflammatorische Zytokine und Eosinophile Granulocyten werden aktiviert nach Konformationsänderung des TLR-7 [67]. Die NK Zellen werden direkt und indirekt

über den TLR-7 aktiviert und bilden die erste Reihe der Verteidigung [68]. B- Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem und sind auch Träger des Rezeptors. Bei den Lymphozyten reguliert der TLR-7 zum Teil die Antikörperproduktion und Bildung des Keimzentrums im Lymphatischen Gewebe, während einer viralen Infektion [70].

1.2.4. TLR-7 Ligand Imiquimod

Imiquimod (R-837) ist ein synthetisch hergestelltes Molekül und gehört zu der chemischen Familie der Imidazoquinoline (Abbildung 4). Die ersten antiviralen Effekte der niedermolekularen Struktur wurden bei Versuchen an Meerschweinchen gezeigt, die mit Herpes Simplex Virus (HSV) infiziert waren [71]. Imiquimod wirkt als Agonist für den TLR-7 und aktiviert dadurch die MyD88 Kaskade [72]. Die medizinisch zugelassene lokale Applikationsform für diesen Liganden ist eine 5% Imiquimod Creme (Aldara®). Sie wird erfolgreich angewandt, um Condylomata acuminata, oberflächliche Basalzellkarzinome und aktinische Keratosen zu behandeln [8]. Die antivirale und antitumorale Aktivität des Agonisten wird lokal primär durch IFN- α induziert.

Aldara diffundiert je nach Applikationsdosis transdermal in das kardiovaskuläre Kompartiment und reagiert systemisch [73]. Das Imiquimod Analoga Resiquimod (R-848) zeigt bei muriner intraperitonealer Injektion eine systemische Reaktion mit Modulation der immunkompetenten Zellen [9]. Die Reaktion der pulmonalen innate und adaptiven Immunzellen nach topischer TLR-7 Applikation wurde bis dato noch nicht erforscht.

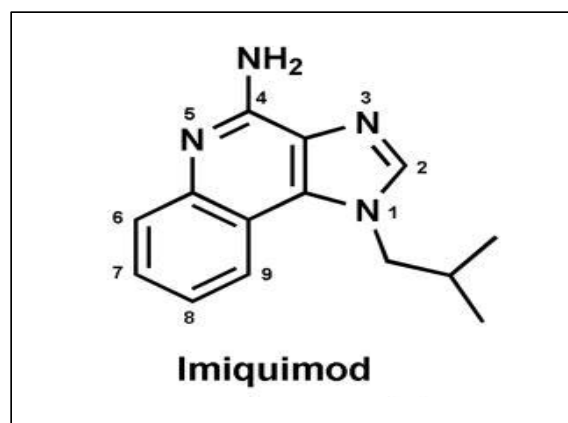


Abbildung 4: Die Molekulare Struktur von Imiquimod 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine (Modifizierte Graphik von Shi et al 2012 [88]).

Die zur TLR-9 Familie gehörenden humanen Toll Like Rezeptoren 7 und 8 werden beide von R-848 aktiviert. Sie reagieren konzentrationsabhängig unterschiedlich. TLR-7 ist sensibler und TLR-8 ist effektiver bei hohen Konzentrationen [58].

1.3. Fragestellung

Die dendritischen Zellen sind eine heterogene Zellpopulation und übernehmen die Antigenpräsentation und Aktivierung des Immunsystems.

Die unreifen DCs in der Peripherie nehmen Antigene auf und entwickeln sich zu reifen DCs. Abhängig von der DC Supopulation, werden verschiedene Zytokine sezerniert. Dabei unterscheiden sich die DC Subtypen in der Expression von TLRs, die verschiedene pathogene Strukturen erkennen. Unterschiedliche TLRs aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren.

Durch die Modulation der DCs (mittels TLR-7 Agonisten) könnte das Immunsystem effektiv beeinflusst werden. In dieser Arbeit wird untersucht, ob eine topische Applikation des TLR-7 Liganden (Imiquimod) auf der Haut, eine Veränderung des Immunstatus in der Lunge bewirkt. Die Idee ist es, Grundlagen zu schaffen, um neue Methoden zu entwickeln, die das respiratorische Immunsystem gezielt beeinflussen.

Durch Zunahme der Antibiotika-Resistenten nosokomialen Keime, sind alternative Behandlungsmethoden dringend erforderlich [53]. Pulmonale Gewebedestruktion, aufgrund einer hyperreaktiven Immunantwort, stellt ein weiteres Problem dar. Modulation der überschießenden Immunreaktion, könnte die pulmonalen Folgeschäden verhindern.

Die respiratorischen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen übernehmen eine Schlüsselrolle bei pulmonalen Infektionen. Sie modulieren das Immunsystem. Vor diesem Hintergrund sollen die Veränderungen der Zusammensetzung der respiratorischen DC Subpopulationen nach Stimulation über die Haut mit Imiquimod untersucht werden.

Die systemische Wirkung des TLR-7 Liganden ist noch nicht vollständig verstanden. Deshalb stellt sich die Frage, ob es zu einer immunsuppressiven oder immunaktivierenden Verschiebung des Immunsystems kommt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
BD Microlance 3	BD, Heidelberg, Germany
ELISA-Plate Microton, 96 W	Greiner bio one, Frickenhausen, Germany
Injekt-F 1ml, 5ml, 10ml, 20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Ecoflo	Dispomed Witt oHG, Glenhausen, D
blue max	BD, Heidelberg, Germany
cell strainer 70µl	BD, Heidelberg, Germany
Feather disposable scalpel	Produkt für die Medizin AG,Köln,D
cell culture dish	Corning Incorporated,NY,USA
Neubaukammer	VWR International, Germany
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
sterile Pipettenspitzen	nerbe plus, Germany

2.1.2. Chemikalien

Stoffgemisch	Bezugsquelle
Hanks Solution (HBSS)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640 mit Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Aldara 5% Creme	Meda AB, Solna, Schweden
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm, Ulm, Germany
NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Formaldehydlösung 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
DPBS	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
RBC Lysis Solution	Qiagen Sciences, Maryland, USA
Mausserum	invitrogen,Camarillo,CA,USA
APC anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set	eBioscience, Frankfurt, Germany
Beads True count	BD, Heidelberg, Germany
CST Beads	BD, Heidelberg, Germany
BD CompBeads	BD, Heidelberg, Germany
CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Berisch Gladbach, Germany
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
BSA	Serva Electrophoresis, heidelberg ,germany
TMB Substrat Reagent Set	BD, Heidelberg, Germany
Mouse IL-10 ELISA MAX Set	BioLegend, Uithoorn, Niederlande
Mouse TNF- α ELISA MAX Set	BioLegend, Uithoorn, Niederlande
Mouse IFN- γ ELISA MAX Set	BioLegend, Uithoorn, Niederlande
LPS 026:B6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
ODN 1826	Invitrogen,Camarillo,CA,USA
CD3/28	BioLegend, Uithoorn, Niederlande
ELISA MAX Standardset	BioLegend, Uithoorn, Niederlande

2.1.3. Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Firma	Klon	Isotyp	Cat. Nr.
CD3e	FITC	BD	145-2C11	A. Ham IgG1, k	553062
CD19	PerCP-Cy5.5	BD	ID3	Rat IgG2a, k	551001
GR1	PE	BD	RB6-8C5	Rat IgG2b, k	553128
SiglecF	PE	BD	E50-2440	Rat IgG2a, k	552126
CD3e	PE-Cy7	BL	145-2C11	Arm Ham IgG	100320
CD4	PE-Cy7	BL	GK1.5	Rat IgG2b, k	100422
CD4	PerCP-Cy5.5	BL	GK1.5	Rat IgG2b, k	100434
CD8a	APC	BL	53-6.7	Rat IgG2a, k	100712
CD11c	APC	BL	N418	Arm Ham IgG	117310
CD45	APC-Cy7	BL	30-F11	Rat IgG2b, k	103116
CD103	PerCP-Cy5.5	BL	2 E7	Arm Ham IgG	121416
F4/80	PB	BL	BM8	Rat IgG2a, k	123 124
I-Ab (MHC II)	FITC	BL	AF-120.1	Mouse IgG2a, k	116406
TCR g/d	FITC	BL	GL3	Hamster IgG	118106
NK-1.1	Pacific Blue	BL	PK136	Mouse IgG2a, k	108722
Foxp3	APC	eBio	FJK-16s	Rat IgG2a, k	17-5773-82
Rat IgG2a	APC	eBio			17-4321-81
CD25	A450 (PB)	eBio	eBio3C7	Rat IgG2b, k	48-0253-82
pDC/IPC	A647	IMGX	120G8.04	Rat IgG2a, k	DDX0390A647
CD11b	PE-TR	Invit	M1/70.15	Rat IgG2b, k	RM2817

2.1.4. Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Akku-Trimmer 1556	Moser Profi line
Rotina 380R	Hettich Zentrifugen, Mülheim a. d. Ruhr, D
Co2-Inkubator HERAcell 240	Kendra, Hanau, Germany
FACS-Aria	BD, Heidelberg, Germany
FACS Canto II	BD, San Jose, CA, USA
Laminar-Flow-Station	Heraeus, Hanau, Germany
Sysmex	Sysmex Gmbh, Germany
autoMACS	Miltenyi Biotec, Germany
Sunrise	Tecan, Crailsheim, Germany
ELISA Wash HydroFlex	Tecan, Crailsheim, Germany
Casy counter	Roche Diagnostics, Germany

2.1.5. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit der *Prism 5.02 software (Graphpad software, Inc.)*. Die signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, wurden über den *one-way ANOVA (analysis of variance)* Test und den *Turkey post* Test bestimmt. Der ANOVA Test bezieht sich auf die Gleichheit und Ungleichheit des Mittelwertes der verschiedenen Gruppen, während der *Turkey post* Test einzelne Paare miteinander vergleicht. Als Signifikant gilt der Wert ab $p < 0.05$.

2.1.6. Computer Software

Computer Software	Bezugsquelle
BD FACSDiva Software 6.1	BD, Heidelberg, Germany
Magellan Tracker software	Tecan, Crailsheim, Germany

2.2. Methoden

2.2.1. Applikation von Imiquimod (Aldara®)

In diesem Experiment wurden männliche C57BL/6N Mäuse verwendet. Dabei handelt es sich um einen Inzuchtstamm von der Firma Charles River.

Da der TLR-7 Signalweg eine geschlechtsabhängige Zytokinproduktion vermittelt, ist es sinnvoll die Versuche an gleichgeschlechtlichen Tieren vorzunehmen [74]. Männliche Tiere sind für dieses Versuchsvorhaben am besten geeignet, da keine zyklusabhängigen Schwankungen auftreten können. Durch den identischen genetischen Hintergrund werden auch für die statistischen Aussagen notwendige n-Zahlen klein gehalten. Die Tiere waren während der Versuchsreihe in *Individually Ventilated Cages* (IVC) untergebracht (*Specific Pathogen Free/SPF* Anlage). Für das Auftragen von Imiquimod wurde ein ca. 1cm² großes Fellareal im Nackenbereich freigeschoren. Die Applikation des TLR-7 Liganden erfolgte direkt auf die Haut mittels 5%iger Imiquimod-Creme (Aldara®). Die Behandlung mit der Creme wurde in der SPF Anlage unter einer Laminar-Flow Station durchgeführt.

Tabelle 3: Aldara Applikationsdosis

Imiquimod/mg	Creme/mg	Creme/ μ l
0,6	12	21
0,3	6	10,5
0,12	2,4	3,5

2.2.2. Isolation der Zellen

Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte gemäß der Genehmigung V54-19c 20-15(1) Gl2078Nr. 29/2009. Nach Tötung der Tiere wurden die Gewebeproben entnommen.

Die Methoden zur Zellisolierung wurden in der Arbeitsgruppe Immunregulation (AG Prof. Dr. Hackstein) etabliert. Das gewonnene Blut wurde mit einer Erythrozyten Lyse Solution behandelt. Für die Isolation der Milzzellen wurde das Organ durch einen Filtersieb gedrückt und nach einmaligem Waschen einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Die Lymphknoten wurden nach Entnahme mechanisch zerkleinert. Das Lungengewebe wurde zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend durch ein Kollagenase/DNase/RPMI – Gemisch (Tabelle 4) für eine Stunde bei einer Temperatur von 37 °C verdaut.

Tabelle 4: Lungenverdauung

Stoffgemisch	Kollagenase A	DNase	RPMI 10% FKS
Stock	5 mg/ml	10000 U/ml	
Verdauungsansatz/Maus	700 µl	5 µl	5ml
Endkonzentration	608 µg/ ml	8,69 U/ml	

Die Zellpellets der Organe wurden in einer exakten Menge HBSS aufgenommen und mit dem Casy Counter wurde die Zellzahl bestimmt.

2.2.3. Färbung der Zellen

Um den Anteil und die Veränderungen der Populationen und Subpopulationen des Immunsystems zu bestimmen, wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Fluorochrom - Antikörpern markiert. Dafür wurde eine 8 Farbkombination angewandt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Fluorochromkombinationen für die Farbmarkierung der Zellen.

Für die Farbmarkierung der Zellen wurden 6 Röhrchen (*tube*) verwendet. Lymph1 *tube* für B Zellen, Thelp Zellen und Tzyt Zellen. DC *tube* mit 8 Farben für DC Subpopulationen und Mph. Gr, Mono *tube* für Granulozyten/Monozyten. Lymph2 *tube* um TCRγ/δ und Treg Zellen zu definieren mit Isotypenkontrolle für Foxp3. *True count tube* für die Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl.

Farben	1 FITC	2 PE-TxR	3 PE	4 PE-Cy7	5 PerCPCy5.5	6 APC	7 APC-Cy7	8 PBlue
Röhrchen								
Lymph1	CD3e		CD4	CD11c	CD19	CD8a	CD45	NK-1.1
DC	I-Ab	CD11b	SiglecF	CD11c	CD103	120G8	CD45	NK1.1
Gr, Mono	I-Ab	CD11b	SiglecF	CD11c		GR1	CD45	F4/80
Lymph2	TCR gd			CD3e	CD4	Foxp3	CD45	CD25
Isotyp Kontrolle	TCR gd			CD3e	CD4	rlgG	CD45	CD25
True count							CD45	

Um ein repräsentatives Ergebnis des Immunstatus der einzelnen Organe zu erhalten, wurden drei extrazellulär Antikörper-Farbkombinationen verwendet. Dadurch konnten die dendritischen Zellen und deren Subtypen, die Lymphozyten und die Makrophagen/Granulozyten dargestellt werden. Für die Identifizierung der regulatorischen T-Zellen wurde eine Intrazellulärfärbung für Foxp3 sowie dessen Isotyp

Kontrolle durchgeführt. Um die absolute Zellzahl der Leukozyten zu bestimmen, wurden in jedem Experiment die *True count* Werte mit berechnet. Für die Anfärbung wurden pro Zellansatz bzw. Tube 1 Millionen Zellen verwendet.

2.2.3.1. Extrazellulär

Zu den verschiedenen Zellansetzen wurde zuerst Mausserum gegeben (Einwirkzeit 15 Minuten), um eine unspezifische Bindung durch den Fc Anteil der Immunglobuline zu verhindern. Danach wurden die unterschiedlichen Antikörper (µl nach Hersteller) dazu gegeben (Tabelle 5). Nach 30 Minuten Einwirkzeit im Dunkeln und auf Eis wurden die Überstände abgewaschen.

2.2.3.2. Intrazellulär

Nach der extrazellulären Anfärbung wurden die intrazellulären Ansätze mit dem *APC anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set* von eBioscience behandelt. Durch die Perforation der Zellen mittels *Fixation/Permeabilization Concentrate* und *Diluent* konnte das FORKHEAD BOX P3 Protein angefärbt werden. Mit dem *Rat IgG2a Isotyp* erfolgte die Negativkontrolle.

2.2.3.3. Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der absoluten Zellzahl der Leukozytenpopulation wurde mit dem *True count* System von BD gearbeitet. Durch die Mitführung von CD 45 positiven *Beads* im Zellgemisch konnte nach der Anfärbung mit APC - Cy7 im FACS AREA Gerät über einen Rechenschritt die Gesamtpopulation der Leukozyten bestimmt werden. Die genaue Angabe der *Beads*-Zahl durch den Hersteller ermöglicht diese Kalkulation:

$$\frac{\text{CD45 Events}}{\text{Beads Events}} \times \frac{\text{Beads Testanzahl}}{\text{Test Volumen}} = \text{absolute Zellzahl}/\mu\text{l}$$

2.2.4. Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometer (FACS/*fluorescence-activated cell sorting*) messen verschiedene physikalische Eigenschaften und erlauben eine molekulare Charakterisierung intakter Zellen.

Das Grundprinzip besteht aus einer hydrodynamischen Fokussierung, optischer Verarbeitung und elektrischer Repräsentation. Eine Suspension von Zellen wird durch Druck aus dem Proberöhrchen in das System gepresst und anschließend durch einen Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert. In einer Frequenz von Einzelzellen (perlenschnurartig) passieren sie im rechten Winkel die Lichtquelle (Laser). Die Eigenschaften der Partikel bzw. der Zellen basieren auf Lichtstreuung und Fluoreszenzmarker. Die Lichtstreuung ist abhängig von der Größe, Granularität, Form und Oberflächenbeschaffenheit. Sie wird durch das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC, *Side Scatter*) definiert. Der FSC misst entlang der Achse des einfallenden Lichts, dabei verhält er sich proportional zum Zellgröße. Die Zellgranularität wird durch den SSC im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen (*Introduction to Flow Cytometry* von BD Biosciences) [75].

Das FACS Canto II Gerät besitzt 3 Laser, durch die eine variable Fluorochrom Kombination möglich ist. Fluorochrome besitzen die Eigenschaft, in einem festgelegten Energiebereich Licht zu absorbieren und in Form von Fluoreszenzlicht wieder abzugeben. Das emetierende Licht wird dann von den PMTs (*Photomultiple Tubes*) registriert. Die *Photomultiple Tubes* wandeln ein Lichtsignal in ein elektrisches Signal um und dienen als Verstärker. Anschließend erfolgt eine digitale Verarbeitung. Jedes Signal wird in eine Zahl konvertiert und einem definierten Messkanal zugeordnet. Die Zellpopulationen können dann in verschiedenen graphischen Formen zum Beispiel in einer Punktwolke (*dot plot*) dargestellt werden (Abbildung 5.A), wo jeder Punkt eine gemessene Zelle repräsentiert. Eine andere Möglichkeit wäre das Konturlinien (*contour plots*) Diagramm, dabei wird der Partikelgehalt von gleichen Zellen dargestellt und verbunden (Abbildung 5.B) [82].

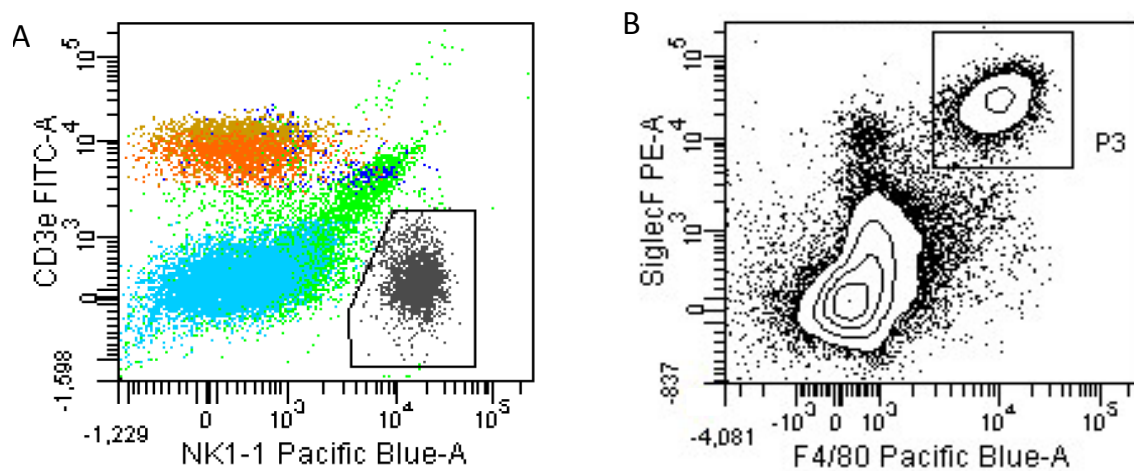


Abbildung 5: Graphische Darstellung für Zellpopulationen durch die Punktwolke und Konturplot (eigene Graphik). (A) am Beispiel der NK Zellen und das Konturlinien Diagramm am Beispiel der Makrophagen (B). Bei der Punktwolke repräsentiert ein Punkt eine Zelle, für die Einteilung in verschiedene Zellpopulationen ist die farbliche Darstellung geeignet. Bei den Konturlinien werden die Zellen zusammengefasst und als Zellpopulation in einem von zentral nach peripher dargestellt.

2.2.4.1. Kompensation

Bei der *Multicolour* Farbanalyse ist eine Kompensation der verwendeten Fluorochrome unerlässlich. Um sicher zu stellen, dass die Floreszenzen nicht in den falschen Kanal strahlen, wurden die Überlappungsbereiche während der Versuchsreihe regelmäßig kontrolliert.

Das Emissionsspektrum von dem fluoreszierenden Licht kann sich an den Grenzbereichen überschneiden. Dadurch würden registrierte Ereignisse in falsche Kanäle strahlen (Abbildung 6). Durch eine Kompensation können diese falsch positiven Ergebnisse verhindert werden. Eine rechnerische Korrektur der Software löst das Problem. Wenn zum Beispiel FITC auch in den PE-Kanal strahlt wird der Anteil der von FITC stammt vom PE Signal abgezogen.

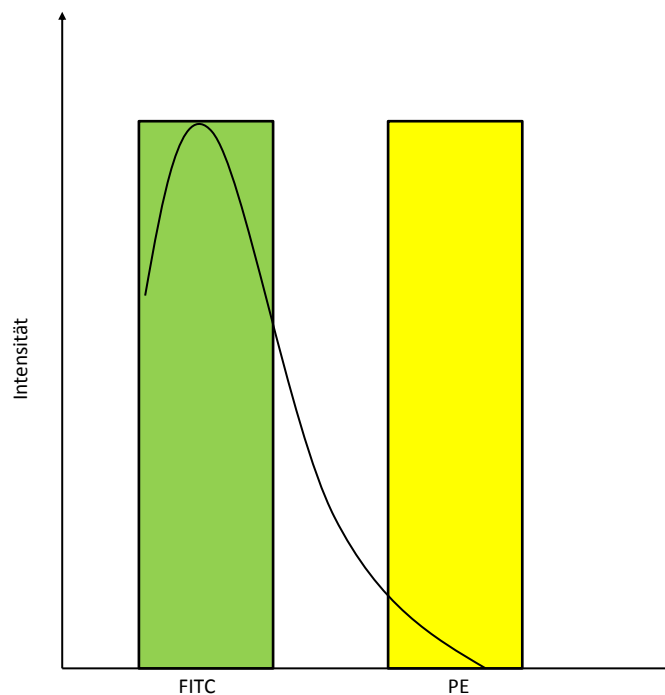


Abbildung 6: Darstellung wie das FITC Emissionsspektrum sich mit dem PE Signal überlappt (eigene Graphik)

2.2.4.2. Applikationseinstellung

Die Applikationseinstellung wird durchgeführt um sicherzustellen, dass die Messergebnisse nicht durch Laserabschwächung verfälscht werden und um die Autofluoreszenz der Mauszellen zu registrieren sowie diese weiterführend von der PMT Registrierung auszuschließen. Dadurch werden nur die Fluoreszenzen von den markierten Antikörpern registriert. Diese Methode ist vorteilhaft für Experimente, die über einen längeren Zeitraum laufen. Bei richtiger Einstellung kann auf eine Kompensation mit Mauszellen vor jeder Messreihe verzichtet werden. Dies führt zusätzlich zu einer Reduzierung des Tierverbrauchs.

Der PMT registriert die Fluoreszenzstrahlung je nach eingestellter Empfindlichkeit. Bei der Applikationseinstellung wird die Volt Einstellung so gewählt, dass die Fluoreszenzen sehr gut registriert und dargestellt werden können. Als Erstes wird eine ungefärbte Probe gemessen und in einer *dot plot* Wolke dargestellt, die durch Veränderung der Voltzahl auf einen vom Programm vorgegebenen Punkt verschoben wird. Im selben Diagramm werden die gefärbten Proben nacheinander präsentiert. Der Abstand zwischen der dot plot Wolke von der ungefärbten und der gefärbten Probe ist entscheidend für die Einstellung. Applikationseinstellung und Kompensation werden danach miteinander verbunden. Nach diesen Einstellungen ist das FACS Gerät auch in der Lage, bei einer Abschwächung des Lasers die automatische Veränderung der Voltzahl auf die definierten Einstellungen umzurechnen. Somit arbeitet der PMT auch nach einem Jahr noch mit der gleichen Leistung.

2.2.5. Magnetische Zellseperation (MACS)

Um eine definierte Zellpopulation zu gewinnen, werden die Zellen durch magnetische Separation aus komplexen Gemischen mit hoher Reinheit für weitere Untersuchungen isoliert. Bei diesem System werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (*MicroBeads*) konjugierte Antikörper verwendet, die die gewünschten Zellen markieren. Die mit *MicroBeads* beladenen Zellen werden auf einer Trennsäule aufgeschichtet und zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen durch Waschen aus der Säule gespült und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS-System kann zur Depletion oder zur Anreicherung (positive Selektion) von Zellpopulationen verwendet werden.

Für die Aufreinigung von CD45⁺ Zellen wurden CD45⁺ *MicroBeads* von Miltenyi Biotec verwendet. Die aus der Lunge isolierten Zellen (ca. 5×10^6 Zellen) wurden in 90 µl

MACS-Puffer (Tabelle 6) aufgenommen, jeweils mit 10µl *Fc-Blocking Reagent* und 10µl *MicroBeads* gut vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die MACS Säule im Magnetfeld mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden nach der Markierung gewaschen, in 500µl PBS aufgenommen und im auto MACS selektiert. Die in der Säule gebundenen Zellen wurden mit 1ml MACS Puffer aus der Säule eluiert. Die positive Selektion wurde 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit der Neubauer-Kammer die Leukozyten Zellzahl bestimmt.

Tabelle 6: MACS-Puffer.

MACS-Puffer	
0,5% BSA	2,5 g BSA
2mM EDTA	2 ml von 0,5M EDTA
bis 500 ml mit PBS auffüllen	

2.2.6. Zellstimulation und Zellkultur

Für die Zellkultur wurde in drei 96 *Well*-Platten pro well 200µl RPMI vorgelegt und die durch das MACS isolierten Leukozyten (100.000/*well*) dazu gegeben. Stimuliert wurden die Zellen von jeder Platte mit jeweils CD3/CD28 ([1µl/ml], Menge 2µl/*well*), LPS 026:B6 ([1µl/ml], Menge 2µl/*well*) oder CpG-ODN 1826 ([6µl/ml], Menge 1,2µl/*well*). Eine Kontrollgruppe wurde jeweils mitgeführt. Das CD3/CD28 wurde mit IL2 kombiniert, um das Überleben der Zellen zu sichern. Nach Inkubation der Zellen mit den drei Substanzen wurden die Überstände in sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein Nachweistest für Antigene oder Antikörper. Die nicht markierte Komponente wird an eine Festphase kovalent gebunden (Vertiefung einer Mikrotiterplatte aus Kunststoff) und anschließend wird durch Zugabe der markierten Antikörper eine enzymatische Reaktion ausgelöst. Dadurch wird ein farbiges Produkt erzeugt. Die Lichtabsorption des farbigen Substrats gibt dann Auskunft über die Konzentration des gebundenen Stoffes.

Mit den ELISA MAX Standard Sets wurden die Konzentrationen von den Zytokinen IL-10, TNFα und IFN-γ bestimmt. Dabei werden im *coating Buffer* gelöste antigenspezifische Antikörper (gegen das Zytokin) an den Träger 24 Stunden vor dem

Test auf einer 96 *Well*-Plate gebunden. Mit einem *Assay Diluent block* (PBS + 1% BSA) werden unspezifische Bindungen verhindert. Danach wurden die mit LPS, CpG-ODN und C3/28 stimulierten Proben sowie die Referenzlösungen (verdünnt bis 1/64) in die Wells verteilt (100µl/*well*). Die Zytokine binden am antigenspezifischen Antikörper. Nach zwei Stunden Inkubationszeit und viermaligem Waschen wurden die *detection* Antikörper dazu gegeben, die an einem andern Epitop des Antigens binden (Abbildung 7, Bindung des Nachweis Antikörpers)

Die indirekte, enzymatische Markierung findet durch Avidin-HRP (Peroxidase) statt, welche eine hohe Affinität zu Biotin markierten Antikörpern besitzt und durch Zugabe, nach 30 Minuten Einwirkzeit und Waschen, von löslicher *TMB Substrat Solution* (tetramethylbenzidine + hydrogen Peroxidase) mit einer blauen Färbung reagiert. Dem entsprechend werden fortführend 100µl *Stop Solution* (2 N H₂SO₄) zu jedem *well* pipetiert, woraufhin bei positiver Reaktion das Blau zu Gelb wird. Die Absorption wurde bei 450nm im *Sunrise* Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Dadurch konnte die Konzentration (pg/ml) in Bezug auf die Referenzwerte, durch die *Magellan Tracker Software* berechnet werden.

Die Waschschritte der Platten erfolgten durch *ELISA wasch/ HydroFlex* voll automatisch. Als Waschpuffer diente PBS mit 0,05% Tween. Unterschiede zwischen der Durchführung von *den ELISA MAX Standard Sets* gab es nur bei der Erstellung des *Coating Buffers*. Bei dem Nachweis von IL-10 muss der pH Wert 6,5 und bei TNFα und IFN-γ 9,5 betragen.

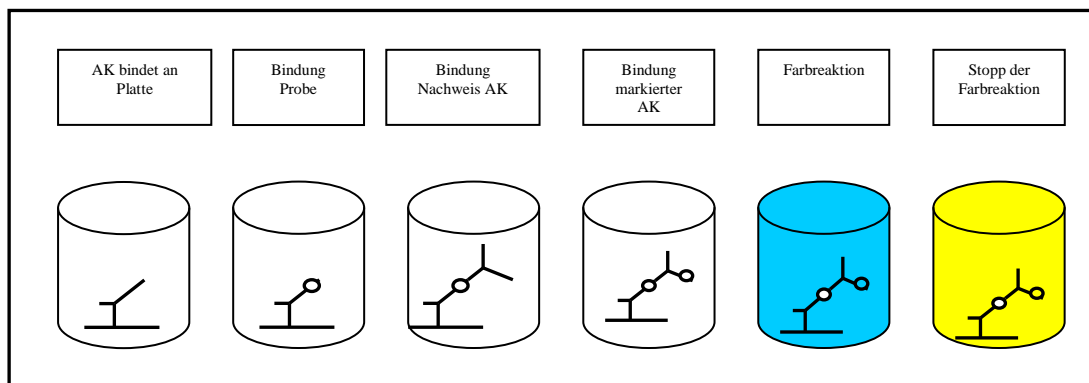


Abbildung 7: Ablauf des Sandwich ELISA (eigene Graphik).

Antikörperbindung auf der ELISA Platte, anschließende Bindung des Zytokins am Antikörper, danach bindet ein 2. Antikörper (*detection* AK) am Zytokin, der zweite Antikörper wird enzymatisch markiert mit Peroxidase. Test ist positiv wenn sich das Blau nach Zugabe der *stop solution* gelb färbt.

2.2.8. Pathologie

Für die pathologische Untersuchung wurden die Organe, Lunge und Lymphknoten vorsichtig entnommen und in einer Formalienlösung konserviert. Anschließend wurden die Proben an das Institut für Tierpathologie an der Freien Universität Berlin geschickt, wo histopathologische Schnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin Färbung hergestellt und abfotografiert wurden. Die Fotos wurden dann für die Auswertung von morphologischen Veränderungen des Lungengewebes und der Lymphknoten nach TLR-7 Hautstimulation verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Pulmonale Veränderungen des Immunstatus nach topischer Applikation des TLR-7 Liganden Aldara®

3.1.1. Identifikation der pulmonalen DC Subpopulationen und respiratorischer Makrophagen

Um die Veränderungen der DCs nach der TLR-7 Hautstimulation genau zu erfassen, wurde eine Methode gebraucht, um DC Subpopulationen spezifisch zu markieren und zu definieren. Durch die Etablierung der 8 Farb-Durchflusszytometrie konnten vier RDC Subpopulationen untersucht werden. Die verschiedenen Oberflächenmarker der RDCs und die Farbkombinationen der entsprechenden Antikörper ermöglichten die Unterteilung in plasmazytoiden DCs, CD103⁺ DCs, monozytäre DCs und CD11b^{high} DCs. Für die Definition der großen DC Subpopulationen wurden die Marker 120G8, CD11b, CD103 und MHC-II (I-A^b) verwendet und eine DC Gate-Strategie eingeführt. Zuerst wurden von der gesamten Zellpopulation die Leukozyten über CD45⁺ separiert sowie anschließend die RDCs über CD11c⁺ und SiglecF⁻ definiert. Von diesen CD11c⁺ Zellen ausgehend wurden die vier RDC Subpopulationen über eine Gate-Strategie weiter definiert. Die pDCs wurden als erstes über 120G8 und CD11b dargestellt, die restlichen RDCs (*non* pDCs) wurden gegen CD103 und MHC-II abgebildet. Die CD103⁺ und MHC-II⁺ DCs sind als respiratorische CD103⁺ DCs definiert worden, während die CD103⁻ DCs in ein neues Gate-Fenster projiziert worden sind. Dort wurden die Oberflächenmarker CD11b und MHC-II zur Unterteilung in respiratorische monozytäre DCs (CD11b⁺MHC-II^{low}) und respiratorische CD11b⁺MHC-II^{high} DCs benutzt. Die neu etablierte 8 Farb-Durchflusszytometrie und Gate-Strategie ermöglichte die Erfassung von Veränderungen der RDC Subpopulationen während der Hautstimulation mit dem TLR-7 Agonisten Imiquimod. Für die respiratorischen Makrophagen wurden aus der CD45⁺ Leukozytenpopulation die SiglecF⁺ und F4/80⁺ Zellen bestimmt und als respiratorische Mph definiert (Abbildung 8).

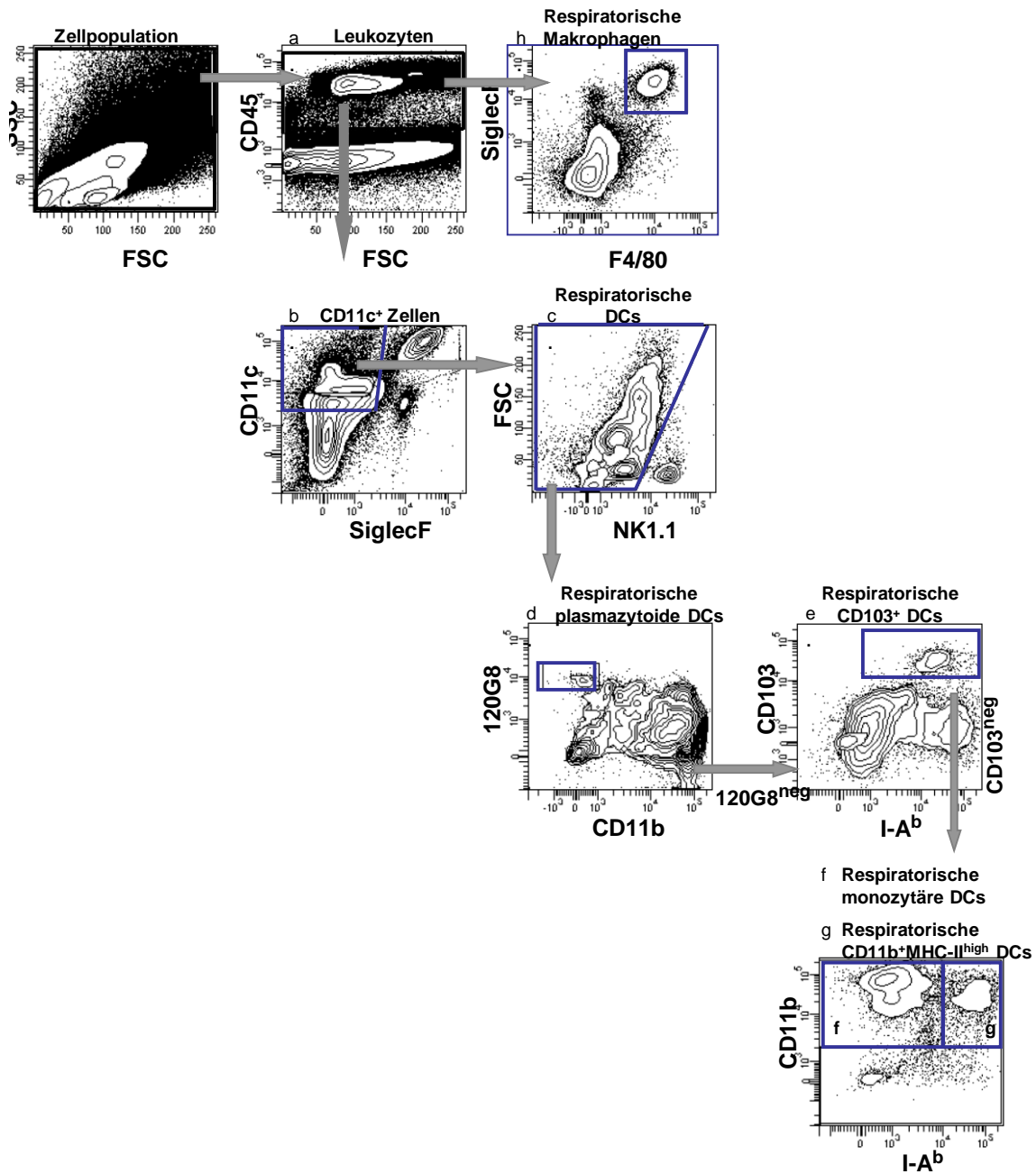


Abbildung 8: Dargestellt ist die Gate-Strategie für die Subpopulationen der DCs und Mph.

a.) über die Leukozytenpopulation ($CD45^+$) werden in einem neuen Fenster (b.) die $CD11c^+$ Zellen definiert und im nächsten Gate (c.) die NK dot plot Wolke ausgeschlossen. Dadurch sind die respiratorischen DCs unter Ausschluss von Mph und NK Zellen in Abbildung c im Gate dargestellt. Für die Erfassung der RDC Subpopulationen werden die plasmazytoiden DCs über $120G8^+$ und $CD11b^-$ definiert (d.) und nicht pDCs im nächsten Fenster eingefügt. (e.) Über die Oberflächenmarker $CD103$ und $MHC-II$ werden die respiratorischen $CD103^+MHC-II^+$ DCs markiert und die $CD103^-$ Zellen in ein neues Gate überführt. Die monozytären DCs (f.) und die $CD11b^+MHC-II^{high}$ DCs (g.) sind beide $CD11b$ positiv, aber unterscheiden sich über die Anzahl des Oberflächenmarkers $MHC-II$. (h.) Die respiratorischen Mph werden aus der Leukozytenpopulation über $F4/80$ und $SiglecF$ definiert.

3.1.2. *Topische Stimulation des TLR-7 erhöht die absoluten und relativen respiratorischen DCs im Gegensatz zu Makrophagen und Granulozyten*

Für die Analyse des Effekts von TLR-7 Hautstimulation auf die respiratorischen Leukozyten wurden Mäuse mit Imiquimod Creme (Aldara®) behandelt. Den Tieren wurde bis zu 7 Tagen der TLR-7 Agonist auf die Rückenhaut aufgetragen, dabei wurden 2 Dosierungen von Aldara verwendet (0,12mg und 0,6mg). Um unerwartete auftretende atypische Effekte aufzeigen zu können, wurde für die Kontrollgruppe eine Placebo Creme benutzt, welche die gleichen Bestandteile mit Ausnahme von Imiquimod enthielt. Die erwähnten Effekte können durch die Behandlung auftreten, sowie durch die Auswirkungen der Medikamenten-zusammensetzung entstehen. Nach 7 tägiger Hautstimulation mit Imiquimod kam es zu keiner effektiven Veränderungen der absoluten respiratorischen Leukozytenzahl (Dosis unabhängig), wohingegen aber die einmalige Behandlung zu einer reduzierten Leukozytenzahl führte (Abbildung 9.A). Um die Veränderungen innerhalb der Leukozytenpopulation aufzuzeigen, wurden die absoluten und relativen Zellzahlen von Makrophagen, Granulozyten und Dendritischen Zellen bestimmt. Bei der Makrophagenpopulation ($CD45^+SiglecF^+F4/80^+$) kam es zu keiner Veränderung der absoluten Zellzahl, außer nach einmaliger Behandlung mit der höchsten Dosis Imiquimod. Dabei verringerte sich die absolute Zellzahl der Makrophagen (Abbildung 9.B). Die absolute Zellzahl der respiratorischen Granulozyten ($CD45^+F4/80^{low/neg}CD11b^{++}GR-1^{++}$) blieb unverändert oder reduzierte sich (Abbildung 9.C). Im Gegensatz zu den Makrophagen und Granulozyten erhöhte sich die DCs ($CD45^+CD11c^+SiglecF^{neg}NK1.1^{neg}$) absolut und relativ nach anhaltender TLR-7 Hautstimulation über 7 Tage (0,6mg Imiquimod; $p < 0.001$, dargestellt in Abbildung 9.D). Die eingeführte Gating Strategie ermöglichte die Unterteilung der Leukozytenpopulation (Abbildung 8). Die Anzahl der absoluten respiratorischen DCs erhöhte sich um 151% nach 7 tägiger Hautstimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe (491322 ± 36872 gegen 195059 ± 15390 ; $p < 0.001$; Abbildung 9.D). Das Verhältnis der DCs zu Makrophagen in der Lunge steigt nach 7 Tage Behandlung mit 0,6mg Imiquimod von 0,7 (± 0.08) auf 1,9 (± 0.2 ; $p < 0.001$).

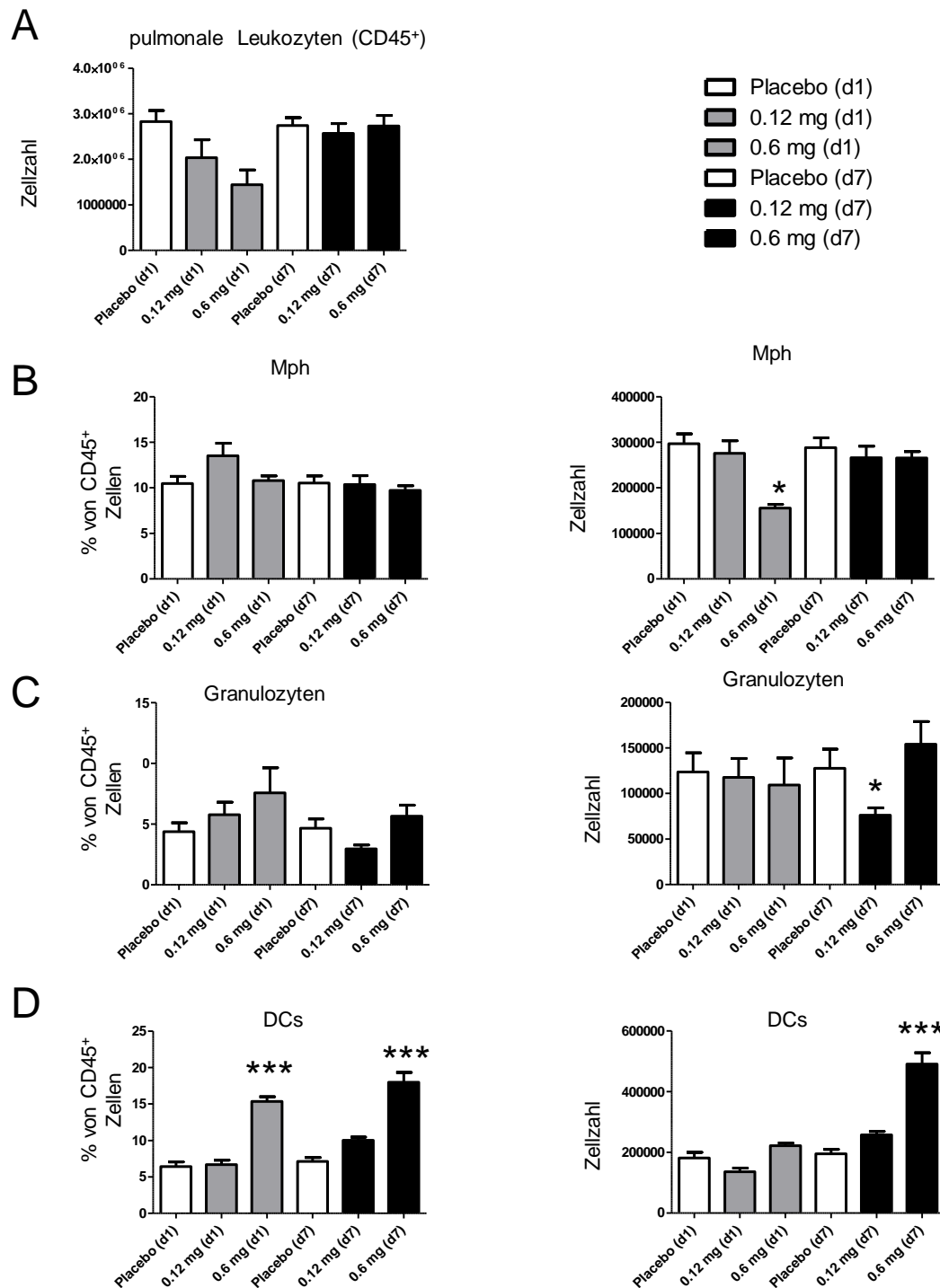


Abbildung 9: Hautstimulation mit Imiquimod erhöhte die absolute und relative Zellzahl der respiratorischen Dendritischen Zellen (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Mäuse wurden mit dem TLR-7 Liganden Imiquimod oder dem Placebo einmalig oder täglich bis zu 7 Tagen behandelt. Die absoluten und relativen respiratorischen Leukozytenpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe *gating* Strategie in Abbildung 8). Dargestellt sind absolute pulmonale Leukozyten (A), respiratorische Makrophagen (B), respiratorische Granulozyten (C) und respiratorische DCs (D) nach Applikation von Imiquimod. Der Mittelwert ist mit der Standardabweichung angegeben, $n \geq 4$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zu den Placebo behandelten Mäusen.

3.1.3. Monozytäre DCs und CD11b^{high} DCs repräsentieren den Hauptanteil der respiratorischen DC Subpopulation nach topischer TLR-7 Stimulation

Nach den deutlichen Veränderungen der respiratorischen DCs nach TLR-7 Hautstimulation, wurde untersucht welche DC Subpopulationen in der Lunge ansteigen. Unter Verwendung einer 8 Farb Durchflusszytometrie (siehe 3.1.1.) wurden plasmazytoide DCs, CD103⁺, monozytäre DCs und CD11b^{high} DCs untersucht. Ein absoluter und relativer Anstieg zeigte sich nach der TLR-7 Behandlung bei den monozytären DCs und CD11b^{high} DCs, wobei die monozytären DCs die stärkste Zunahme zeigten (Abbildung 10.A). In der Lunge stiegen die relativen respiratorischen monozytären DCs von 2-3% aller CD45⁺ respiratorischen Leukozyten auf $\geq 10\%$ nach der Behandlung mit 0,6mg Imiquimod ($p < 0.001$, Abbildung 10.A). Nach 24 Stunden zeigte sich bereits bei der Dosis von 0,6mg Imiquimod ein signifikanter Anstieg der absoluten und relativen monozytären DCs. Bei den CD11b^{high} DCs kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der absoluten und relativen Zellzahl, aber erst nach einer 7 tägigen Behandlung mit 0,6mg Imiquimod (Abbildung 10.A). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den plasmazytoiden DCs und CD103⁺DCs geringe Veränderungen in Bezug auf die Kontrollgruppe. Nach 24 Stunden Behandlung mit 0,12mg und 0,6mg Imiquimod kam es zu einem Abfall der relativen plasmazytoiden DCs und CD103⁺ DCs in der Lunge (Abbildung 10.A). Die Veränderungen der DC Subpopulationen zeigten sich pulmonal absolut und relativ, woraufhin die Zusammensetzung der respiratorischen DCs nach TLR-7 Hautstimulation untersucht wurde. Monozytäre DCs stiegen im Vergleich zu den anderen respiratorischen DC Subpopulationen signifikant von 42-44% auf 70-80% an ($p < 0.001$; Abbildung 10.B). Nach 7 tägiger Behandlung mit 0,6mg Imiquimod konnte ein ähnlicher Anstieg der monozytären DCs festgestellt werden wie bei der einmaligen Behandlung mit 0,6mg Imiquimod. Bei den plasmazytoiden DCs, CD103⁺ DCs und CD11b^{high} DCs verkleinert sich der Anteil im DC Kompartiment nach TLR-7 Hautstimulation (Abbildung 10.B). Bei Betrachtung der respiratorischen DCs ist sowohl nach einmaliger als auch nach 7 tägiger Behandlung mit Imiquimod die Veränderung der Zusammensetzung von den respiratorischen DC Subpopulationen fast identisch. Betrachtet man die mit dem Placebomedikament behandelte Kontrollgruppe sieht man bei den DC Subpopulationen kaum einen Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 7 (Abbildung 10.B). Daraus lässt sich schließen dass keine Beeinflussung der Zusammensetzung von den DC Subpopulation durch die lokal aufgetragene Placebo Creme statt findet.

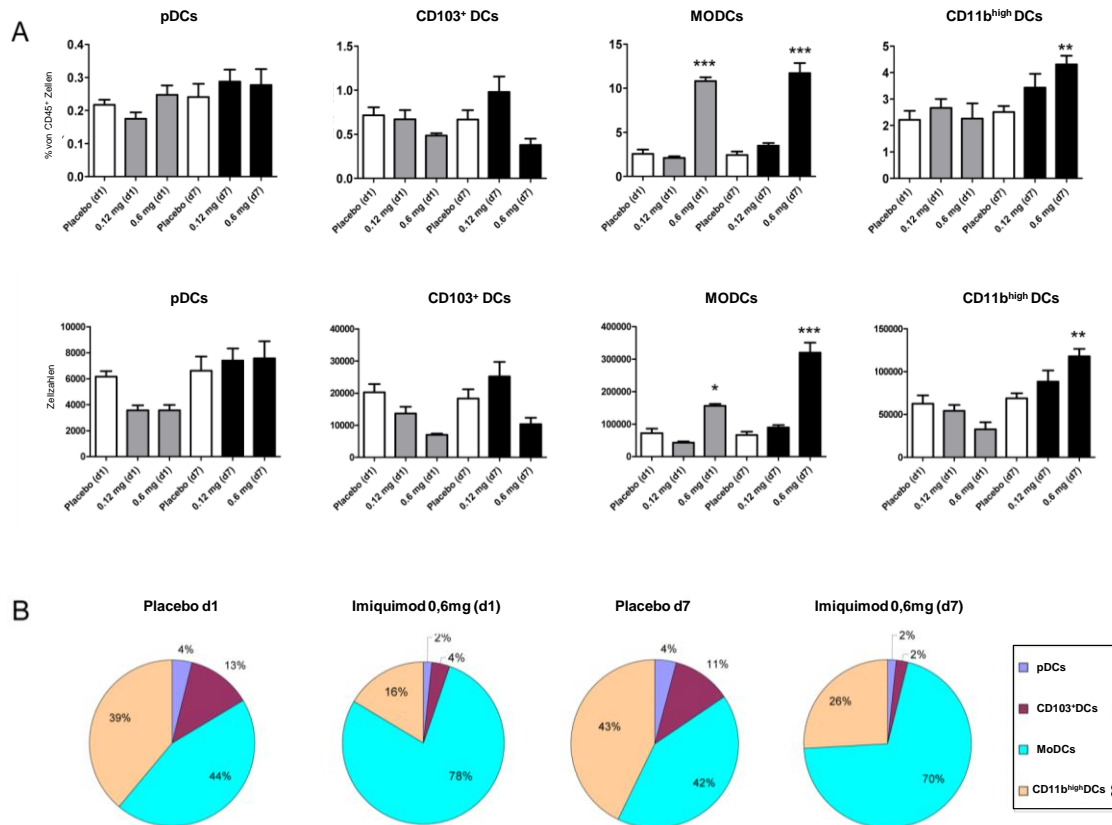


Abbildung 10: Anhäufung von respiratorischen DCs nach TLR-7 Hautstimulation wird durch einen Anstieg von monozytären DCs und CD11b^{high} DCs verursacht (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Dargestellt sind die respiratorischen DC Subpopulationen pDCs, CD103⁺DCs, MoDCs und CD11b^{high} DCs nach TLR-7 Hautstimulation mit Imiquimod im Vergleich zu den Placebo behandelten Tieren (A,B). Bei den CD45⁺ Leukozyten steigen von den DC Subpopulationen in der Lunge die MoDCs und CD11b^{high} DCs absolut und relativ signifikant an (A). Dabei zeigen die MoDCs auch schon nach 1 Tag bei der Dosis von 0,6mg Imiquimod einen Anstieg. Bei der Zusammensetzung der respiratorischen DC Subpopulationen steigen die MoDCs im Vergleich zu den anderen DC Subpopulationen signifikant an (B; $p < 0.001$). Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, $n \geq 4$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zu den Placebo behandelten Tieren.

3.1.4. *Reduktion der respiratorischen B Lymphozyten und Anstieg respiratorischer Natürlicher Killer Zellen nach Stimulation der Haut mit Imiquimod*

Zur Abklärung ob sich auch andere respiratorische Leukozytenpopulationen nach TLR-7 Hautstimulation beeinflussen lassen, wurden ebenfalls weitere Zellen des angeborenen Immunsystems und die Lymphozyten untersucht. Die klassischen B- und T-Zellen wurden über die typischen Oberflächenmarker CD45, CD19, CD3e, CD8a und CD4 identifiziert und dargestellt (Abbildung 11). Die B-Zellen wurden über $CD45^+CD19^+CD3e^-$ markiert (Abbildung 11 B.) und alle $CD45^+CD3e^+CD19^-$ Zellen wurden als T-Zellen (Abbildung 11.A.) definiert und in einem neuen Fenster zur weiteren Unterteilung in $CD8^+$ Tzyt Zellen (Abbildung 11.D.) und $CD4^+$ T-Helfer Zellen (Abbildung 11.C.) überführt. Die Analyse der Lymphozytenpopulationen zeigte einen kurzzeitigen, aber signifikanten Abfall der respiratorischen $CD3^+$ T-Zellen, nach einmaligen Auftragen von Imiquimod auf der Rückenhaut der Maus (0,6mg; $p<0.001$). Es kam dabei zu einem vorübergehenden Verlust von $CD4^+$ T-Helfer Zellen und $CD8^+$ Tzyt Zellen (Abbildung 12.A, B). Die absoluten $CD3^+$ T-Zellen wurden nicht durch eine 7 tägige Behandlung mit Imiquimod beeinflusst (Abbildung 12.B). Bei der Zusammensetzung der $CD45^+$ Leukozyten kam es nach TLR-7 Hautstimulation zu keinen eindeutigen Veränderungen der relativen T-Zellpopulation (Abbildung 12.A.). Im Gegensatz dazu kam es zu einer absoluten und relativen Verringerung der $CD19^+$ B-Zellen, sowohl nach einmaliger als auch nach 7 tägiger Applikation des TLR-7 Agonisten (Abbildung 12.A, B). Die relativen B-Zellen reduzieren sich eindeutig an Tag 1 und 7 bei der Verwendung von 0,6mg Imiquimod ($p<0.001$). Nach einmaliger Behandlung mit der geringen Dosierung von 0,12mg Imiquimod reduzierten sich bereits die absoluten Zellzahlen der $CD19^+$ B-Zellen signifikant ($p<0.01$).

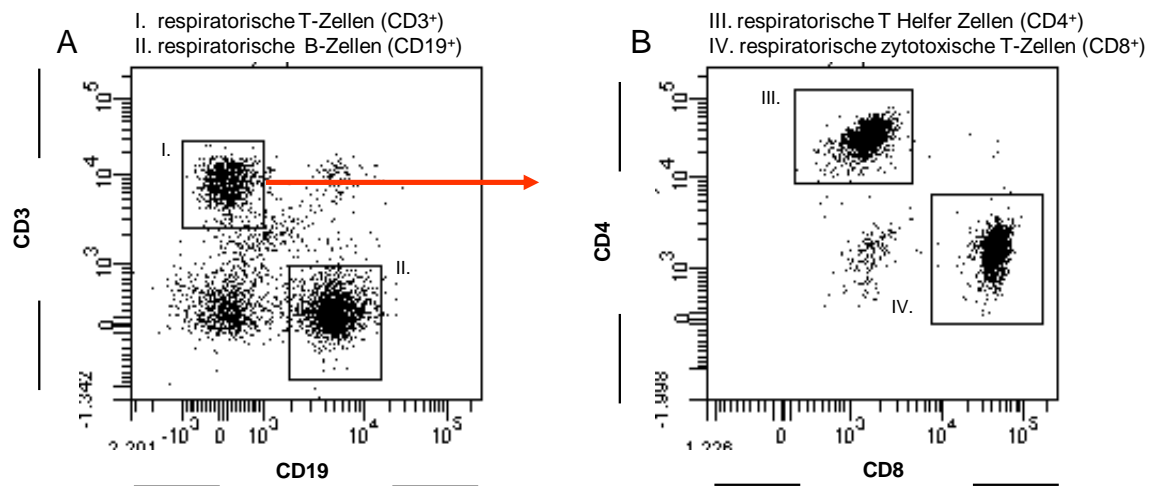


Abbildung 11: Lymphozyten *gating*-Strategie durch spezifische Oberflächenmarker (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Aus einer CD45⁺ Zellpopulation wurden zuerst die B-Zellen über CD3e⁻CD19⁺ (B) identifiziert und die T-Zellen als CD3e⁺CD19⁻ (A.) in ein neues Fenster übertragen. Die CD3e⁺ T-Zellen wurden durch die Oberflächenmarker, in CD4⁺ T Helfer Zellen (C.) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (D) unterteilt.

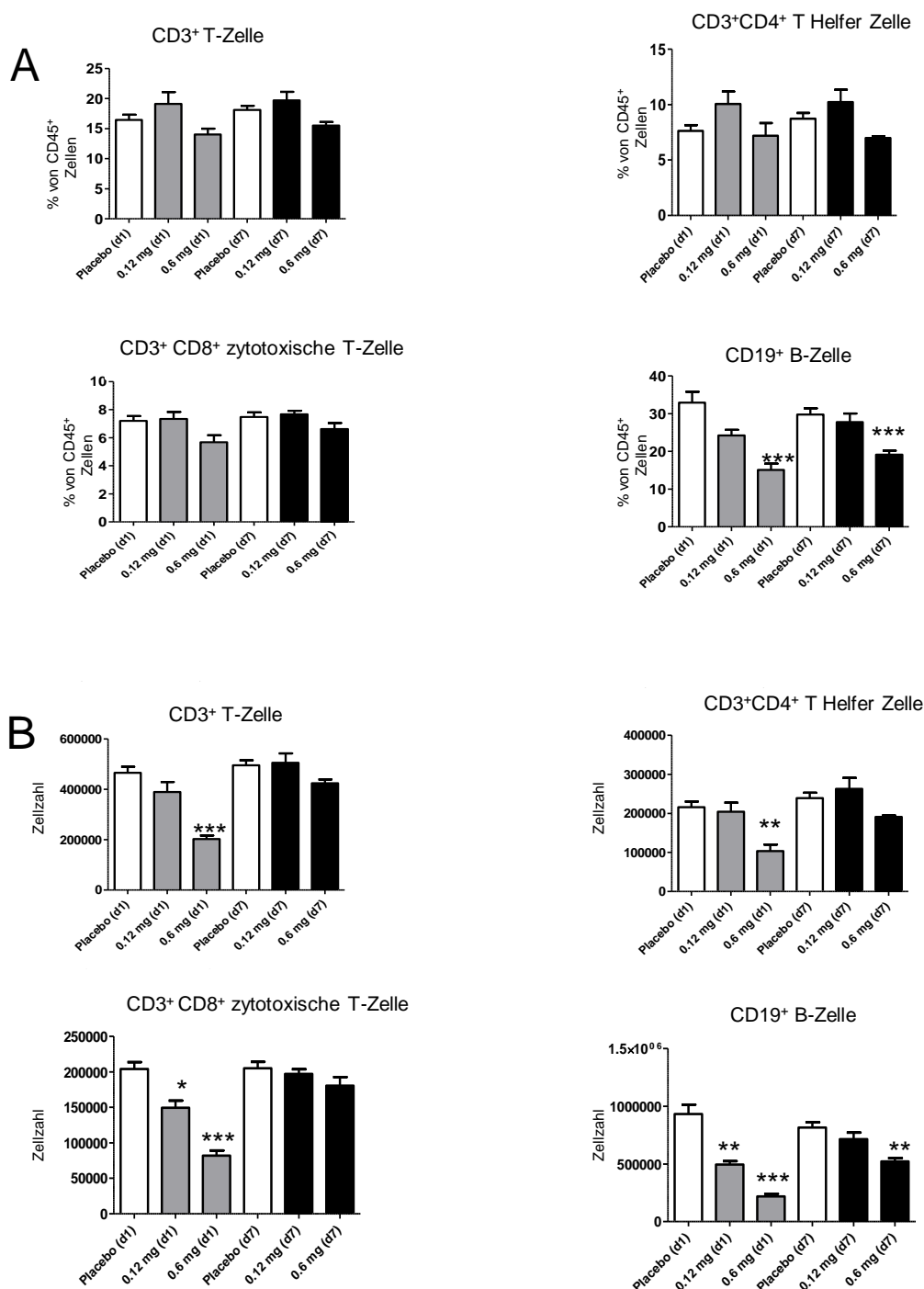


Abbildung 12: Verringerung der respiratorischen B und T- Zellpopulation nach Hautstimulation mit Imiquimod (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Identifiziert und analysiert wurden die relativen (A) und absoluten (B) B und T- Zellen mittels Durchflusszytometrie, nach lokaler Behandlung der Mäuse mit dem TLR-7 Liganden. Die CD3⁺ T-Zellen sinken nach einem Tag signifikant ab ($p < 0.001$), aber verändern sich nicht nach 7 tägiger Applikation. Bei den CD19⁺ B-Zellen kommt es signifikant zu einer relativen und absoluten Abnahme der Zellpopulation. Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, $n \geq 4$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu den Lymphozyten stiegen die respiratorischen NK Zellen absolut und relativ erst nach 7 tägiger Behandlung an (Abbildung 13 A, B). Definiert wurde die NK Population als $CD45^+NK1.1^+CD3e^-$ Immunzellen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe *gating* Strategie Abbildung 15 C). Die Veränderung der NK Zellen, zeigt eine Beeinflussung des angeborene Immunsystem durch Imiquimod auf. Nach 7 tägiger lokaler Anwendung von Imiquimod stieg die absolute Zellzahl der respiratorischen NK Zellen von 195856 (± 14504) auf 458312 (± 39096) an ($p < 0.001$, Abbildung 13 B).

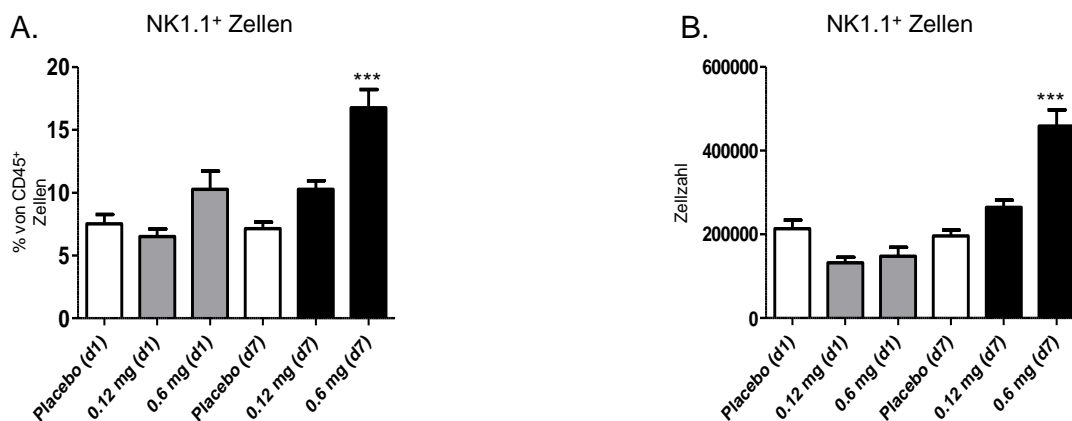


Abbildung 13: Anstieg der respiratorischen NK-Zellen nach 7 tägiger Hautstimulation mit Imiquimod (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, $n \geq 4$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Respiratorisch Treg Zellen und $TCR\gamma/\delta$ T-Zellen (*T cell receptor γ/δ*) wurden ebenfalls von der Hautstimulation mit Imiquimod gering beeinflusst (Abbildung 14). Die respiratorischen $TCR\gamma/\delta$ -Zellen wurden zuerst aus den $CD45^+$ Leukozyten über die Oberflächenmarker als $CD3e^+CD4^-$ Zellen in einem neuen Fenster dargestellt und anschließend über den $TCR\gamma/\delta$ bestimmt (Abbildung 15 A). Für die Identifikation der respiratorischen regulatorischen T-Zellen ($CD45^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$) wurde eine intrazelluläre FoxP3 Färbung durchgeführt. Bei der *gating* Strategie wurden im ersten Fenster die $CD4^+CD3e^+$ Zellen markiert und in eine neues Diagramm übertragen, in welchem anschließend die $CD25^+FoxP3^+$ Population als Treg Zellen definiert wurden (Abbildung 15 B). Die Treg Zellen neigen zu einer absoluten und relativen Verringerung nach der TLR-7 Hautstimulation, allerdings ohne Signifikanz (Abbildung 14.B). Bei den

TCR γ/δ T-Zellen ist nach einem Tag mit der Dosierung von 0,6mg Imiquimod ein absoluter und relativer Anstieg feststellbar (Abbildung 14.A), aber ebenfalls ohne Signifikanz. Die lokale Behandlung über 7 Tage führte nur zu einer geringen Veränderung der TCR γ/δ T-Zellpopulation (Abbildung 14.A).

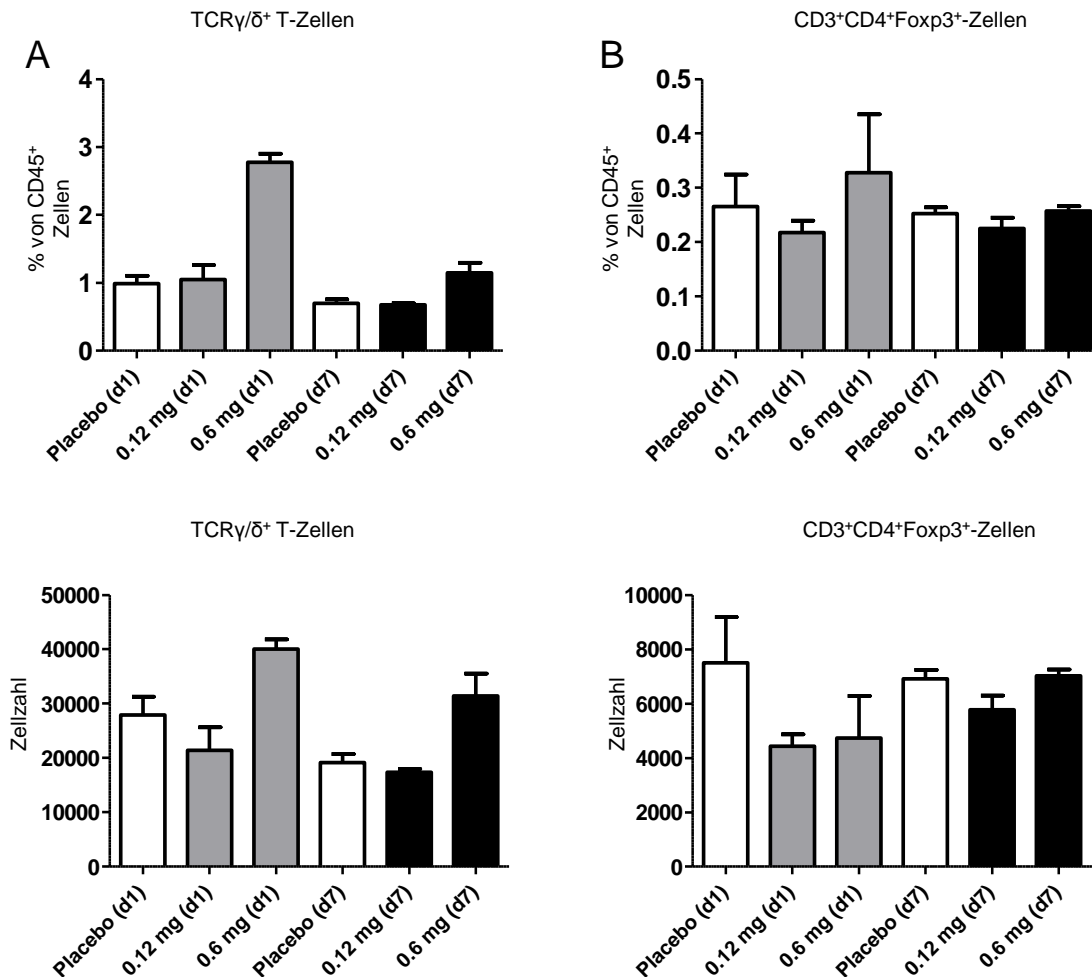


Abbildung 14: TLR-7 Hautstimulation beeinflusst die respiratorischen TCR γ/δ T-Zellen (A) und regulatorische T-Zellen (B (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ Zellen)) nur im geringen Ausmaß (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Die Analyse der Immunzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, n≥4; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

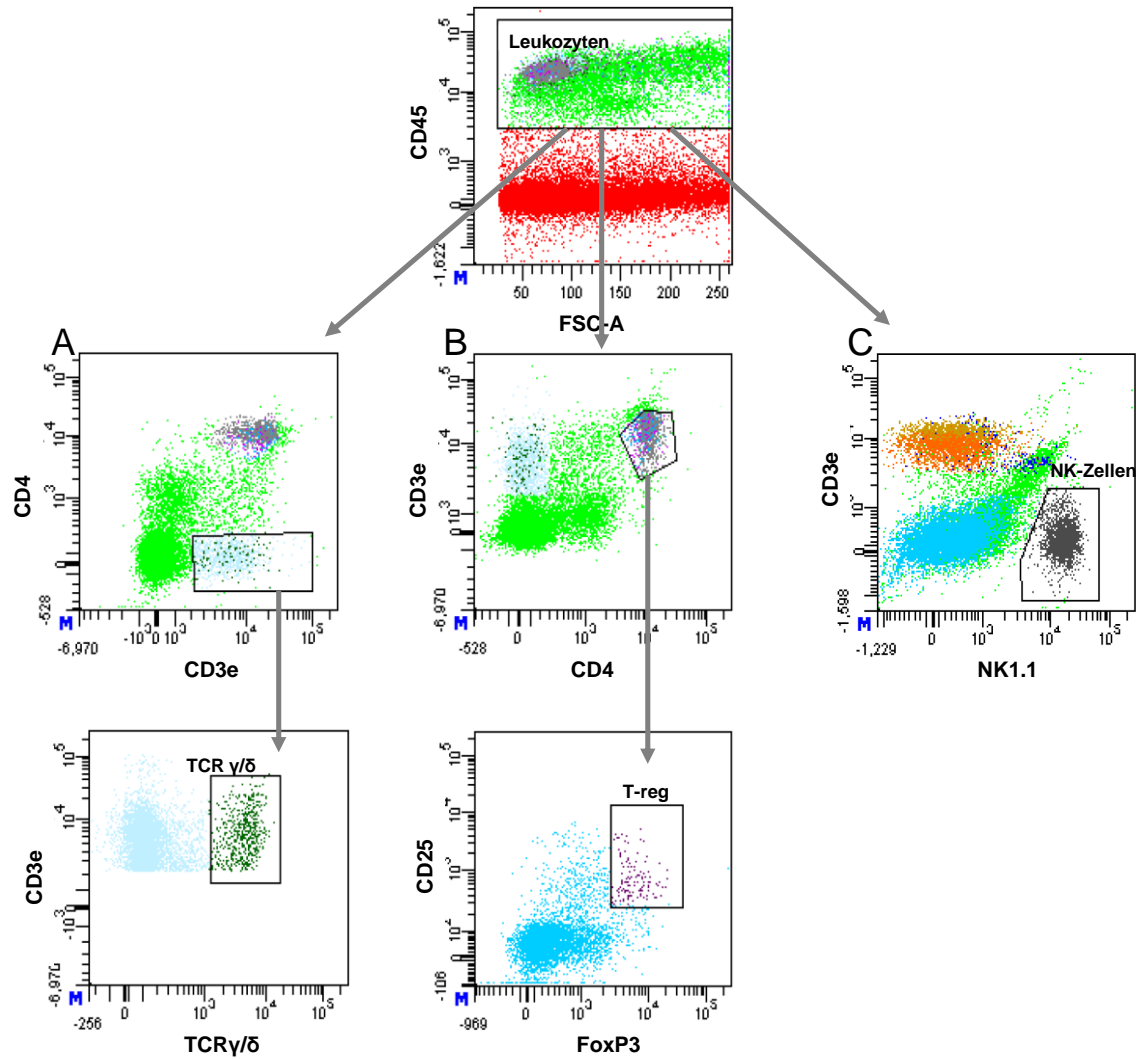


Abbildung 15: Dargestellt ist die Gate-Strategie für TCRγ/δ T-Zellen (A), regulatorische T-Zellen (B) und NK Zellen (C). Die spezifischen Oberflächenmarker wurden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie registriert. Für die Analyse wurden die Zellen in Punktwolken (*dot plots*) mit verschiedenen Farben aufgezeigt, dadurch konnten die einzelnen Zellpopulationen unterschieden werden.

TCRγ/δ T-Zellen: CD45⁺CD4⁺CD3e⁺TCRγ/δ⁺

Treg: CD45⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺

NK Zellen: CD45⁺CD3e⁺NK1.1⁺

3.1.5. *Topische TLR-7 Aktivierung beeinflusst Zytokin Produktion respiratorischer Leukozyten*

Nach der Beobachtung, dass die Hautstimulation mit dem TLR-7 Agonisten Imiquimod die Anzahl der respiratorischen Leukozyten veränderte, wurde nach weiteren messbaren Parametern gesucht, die das Immunsystem beeinflussen. Da Immunzellen nicht nur über Oberflächenmarker und ihre Liganden moduliert werden, sondern auch über Zytokine, wurde ihre Produktion durch respiratorische CD45⁺ Leukozyten nach TLR-7 Hautstimulation untersucht. Dafür wurden alle CD45⁺ Zellen über magnetische Zellseparation mittels magnetischer Mikropartikel gekoppelter Antikörper isoliert und mit CpG-ODN (Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotid), LPS (Lipopolysaccharid) und CD3/28 stimuliert. Die Aktivierung der CD45⁺ Leukozyten erfolgte durch LPS über die TLR-4 und durch CpG-ODN über die TLR-9 Stimulation. Für die Beurteilung der Zytokine wurde der TNF α , das IL-10 und das IFN- γ bestimmt. Bei der Stimulation der Zellen mit CD3/28 zeigten sich nur minimale nicht aussagekräftige Veränderungen der Zytokine. Deshalb wurde nach einigen Experimenten auf die Stimulation der CD45⁺ Zellen mit CD3/28 verzichtet. Aus diesem Grund ist dies bei der weiteren Ausführung der Ergebnisse nicht erwähnt und auch nicht in der Abbildung dargestellt. Das Ergebnis zeigte, dass bei einmaligen und 7 täglich behandelten Tieren nach LPS und CpG-ODN Stimulation eine signifikante Reduzierung des IFN- γ feststellbar ist (Abbildung 16.A). TNF α reduzierte sich ebenfalls nach 7 tägiger Applikation von Imiquimod, insbesondere bei der LPS Stimulation kam es zu signifikanten Veränderungen ($p < 0.001$; Abbildung 16.B). Dies trat bei der hohen, sowie ebenfalls bei der niedrigen Dosierung des TLR-7 Agonisten auf. Nach 24 Stunden reduzierte sich der TNF α bei der Verwendung von 0,12mg Imiquimod und CpG-ODN Stimulation. Im Vergleich dazu war ein Anstieg bei der 0,6mg Dosierung nach der CpG-ODN Stimulation zu beobachten. Das Zytokin IL-10 stieg im Gegensatz zu dem TNF α und dem IFN- γ nach 7 Tagen an, sowohl bei der LPS als auch bei der CpG-ODN Stimulation (Abbildung 16.C). Nach der einmaligen Behandlung mit 0,12mg Imiquimod kam es zu einer signifikanten Abnahme der IL-10 Menge, und zu einem geringen Anstieg nach der Verabreichung der höchsten Dosis. Vergleicht man TNF α und IL-10 Produktion an Tag 1 und Tag 7 fällt eine gegensätzliche Reaktion nach der LPS Stimulation auf. An Tag 7 sinkt TNF α währenddessen IL-10 steigt und an Tag 1 scheint TNF α zu steigen währenddessen IL-10 sinkt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse das durch eine Hautstimulation mit dem TLR-7 Aktivator Imiquimod die respiratorische Zytokinproduktion beeinflusst wird. Dabei sinkt nach 7 Tagen Behandlung die Menge des IFN- γ und des TNF α wohingegen das IL-10 steigt.

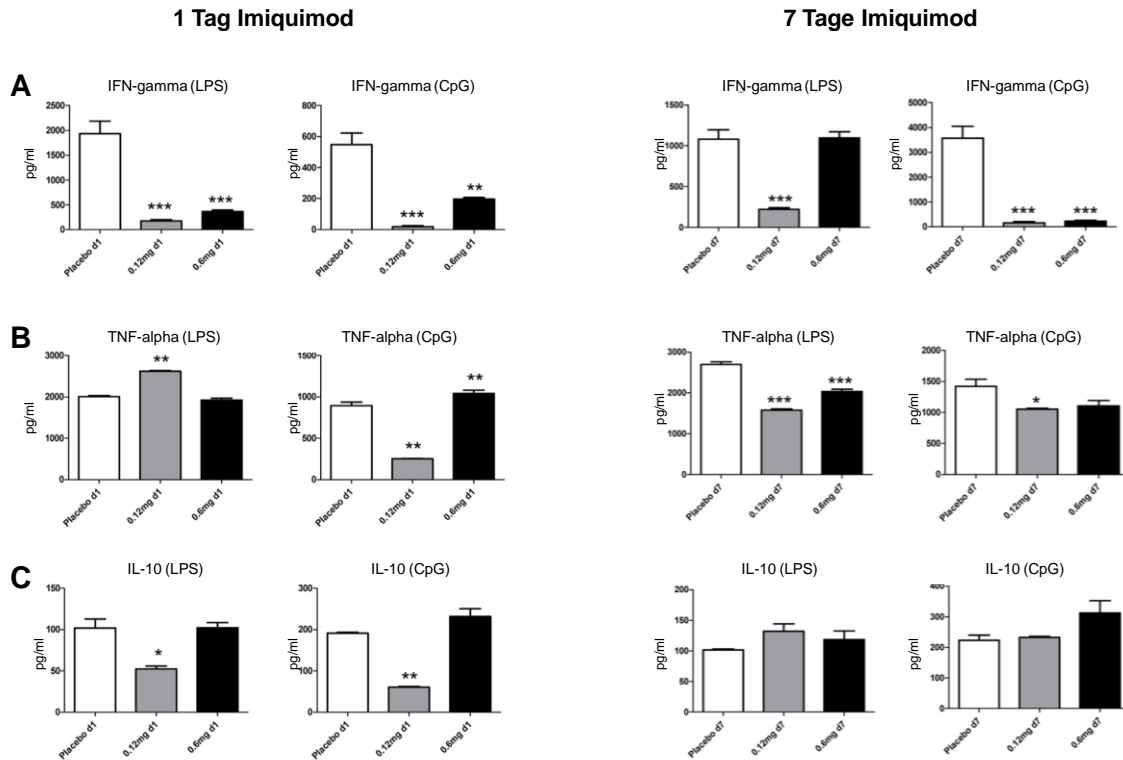


Abbildung 16:TLR-7 Hautstimulation verändert die respiratorische Zytokinproduktion (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Die respiratorischen Leukozyten wurden nach 1 und 7 tägiger Behandlung mit Imiquimod oder Placebo magnetisch separiert und mit LPS oder CpG-ODN stimuliert. Anschließend wurden (A) IFN-gamma, (B) TNF-alpha und (C) IL-10 bestimmt. In Zellproben, die nicht stimuliert wurden, konnten keine Zytokine nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 27 pg/ml). Das IFN- γ sinkt signifikant nach einem Tag und nach 7 Tagen Behandlung mit Imiquimod bei LPS und CpG-ODN Simulation (A). TNF α sinkt ebenfalls an Tag 7 im Gegensatz zu IL-10, welches nach 7 Tagen steigt (B; C). Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, $n \geq 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.1.6. *Modulation der respiratorischen Leukozyten nach TLR-7 Stimulation ist verknüpft mit den Veränderungen im peripheren Blut*

Die respiratorische CD45⁺ Leukozytenpopulation wird unter anderem durch Abwanderung, Rekrutierung und Apoptose beeinflusst. Über das periphere Blut gelangen Leukozyten in die Lunge und können dadurch einen Anstieg der Immunzellen hervorrufen. Deshalb erfolgte die Untersuchung der großen CD45⁺ Subpopulationen im peripheren Blut nach TLR-7 Hautstimulation. Analysiert wurden Granulozyten, Monozyten, DCs, Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) und NK Zellen nach 1 und 7 tägiger Behandlung mit Imiquimod. Die Veränderungen der Subpopulationen im Blut wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Granulozyten zeigten keine signifikanten Veränderungen im Blut, im Gegensatz zu den Monozyten, bei denen es zu einem Abfall nach 24 Stunden und einen Anstieg nach 7 Tagen Behandlung mit 0,6mg Imiquimod kommt (Abbildung 17. B). Die DCs und NK Zellen im Blut steigen bei der einmaligen sowie bei der siebenmaligen Applikation von 0,6mg des TLR-7 Agonisten (Abbildung 17.C, D), wobei zusätzlich die NK Zellen auch bei der niedrigen Dosis an Tag 7 steigen (Abbildung 17.D). Bei den Lymphozyten im Blut kam es zu einer signifikanten Abnahme der CD19⁺ B-Zellpopulation sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 der Behandlung (Abbildung 17.F). Im Gegensatz dazu zeigten CD3⁺ T-Zellen nur moderate Veränderungen nach TLR-7 Stimulation (Abbildung 17.E). Zusammenfassend zeigt sich das durch das Auftragen von Imiquimod auf die Rückenhaut der Mäuse die NK Zellen, die DCs und die CD19⁺ B-Zellen im Blut ähnliche Veränderungen zeigen wie in der Lunge. Das lässt einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anstieg oder Abfall der Leukozytenpopulationen im Blut und den Zusammensetzungen der respiratorisch CD45⁺ Subpopulationen vermuten.

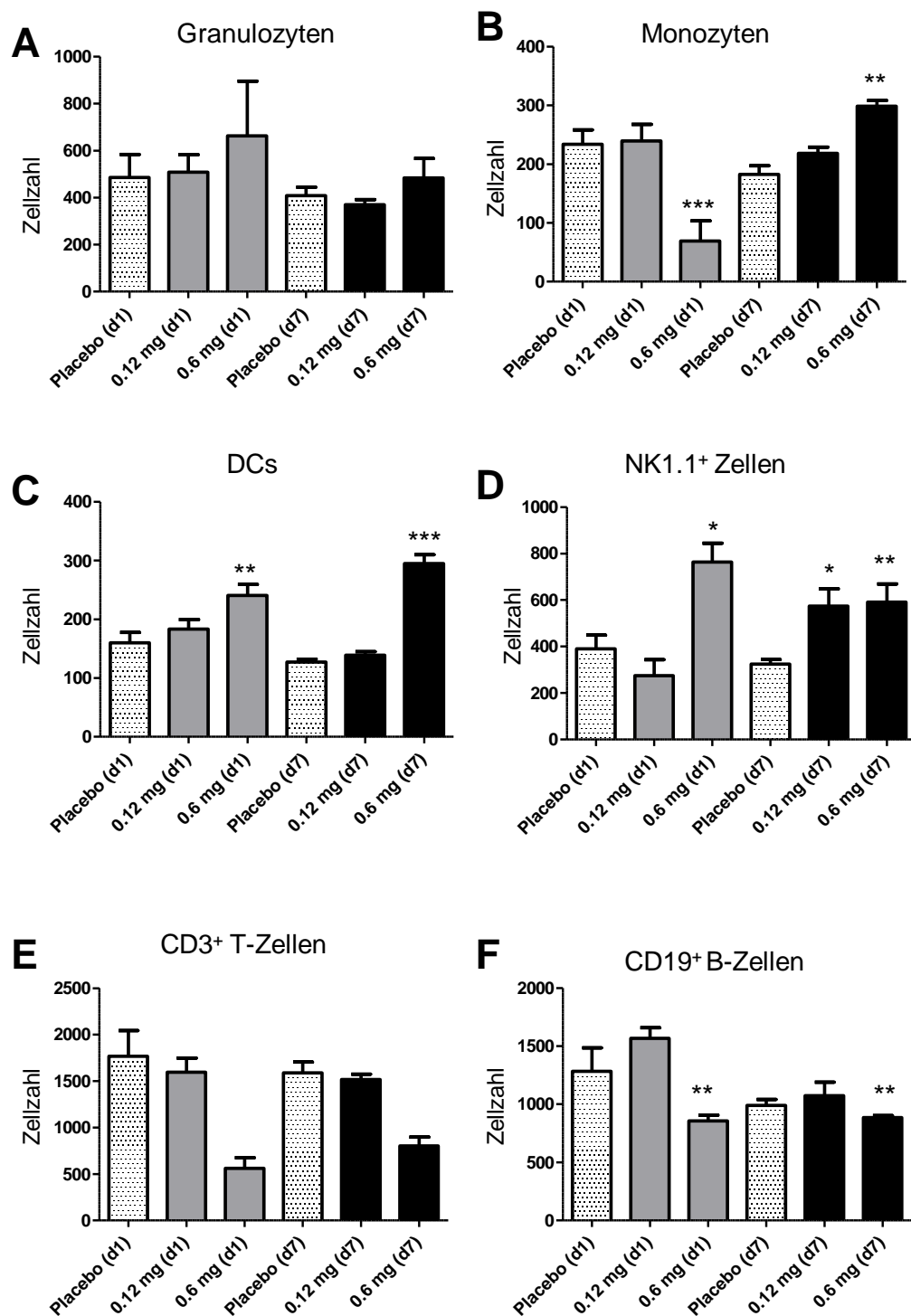


Abbildung 17: Veränderung der respiratorischen Leukozyten Subpopulationen sind verknüpft mit Verschiebungen der gleichen Subpopulationen im Blut nach TLR-7 Stimulation (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]).

Dargestellt sind (A) Granulozyten, (B) Monozyten, (C) DCs, (D) NK Zellen und (E/F) Lymphozyten (T und B-Zellen) nach Hautstimulation mit Imiquimod und Analysierung mittels Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, $n \geq 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe

3.1.7. *Topische TLR-7 Stimulation bewirkt keine bronchoalveoläre Inflammation*

Die Modulation der respiratorischen Leukozyten durch lokale Hautstimulation des TLR-7 konnte in den Experimenten nachgewiesen werden und warf nun die Frage auf, ob gleichzeitig auch eine Entzündung der Lunge durch die Behandlung mit Imiquimod verursacht wird. Dafür wurden die Lungen von den mit Imiquimod behandelten Mäusen im histopathologischen Schnittbild nach einer Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) untersucht. Es wurden keine Zeichen einer pathologischen Veränderung im Lungengewebe nach einer Behandlung mit Imiquimod beobachtet. Die Alveolarsepten waren nicht verdickt und der Luftraum war weder vergrößert noch verkleinert im Vergleich zur Placebogruppe (Abbildung 18.A.I.). Eine Infiltration von Entzündungszellen in die Zellwand der Bronchiolen konnte bei den Imiquimod behandelten Tieren ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18.A.II.). Bei der pathologischen Untersuchung des Lungenparenchyms konnte kein Unterschied zwischen einmaligen und siebentägigen Aldara ausgesetzten Tieren im Vergleich zu den Placebo Mäusen detektiert werden (Abbildung 18.A). Neben der Beurteilung des Lungengewebes wurde auch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt, um die Leukozytenzahl in den Bronchien und Alveolen zu bestimmen. Die absoluten CD45⁺ Leukozyten wurden durch Hautstimulation des TLR-7 Agonisten nicht signifikant an Tag 1 oder Tag 7 verändert (Abbildung 18.B). Dieses Ergebnis korreliert mit der Analyse der totalen respiratorischen Leukozytenzahl im Lungenhomogenat (Abbildung 9.A).

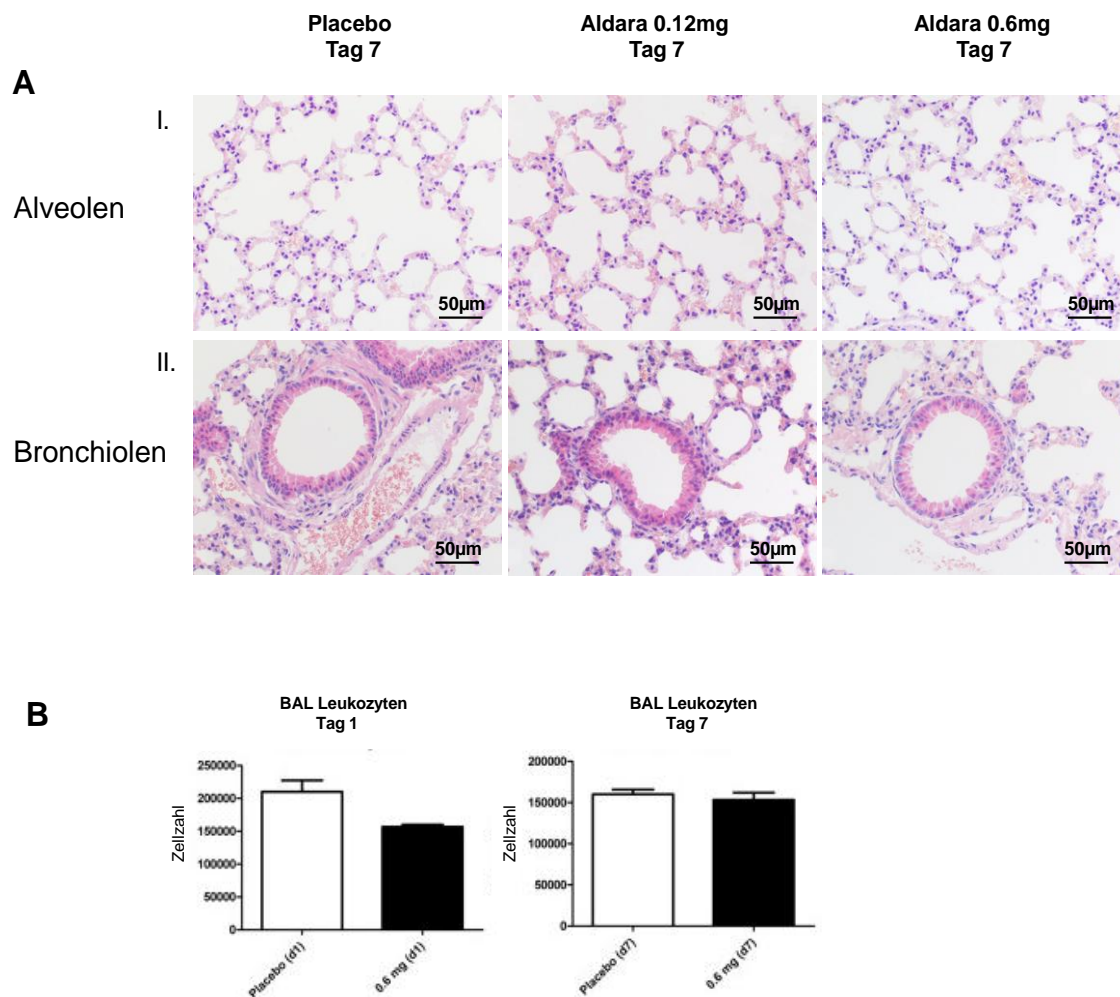


Abbildung 18: TLR-7 Hautstimulation zeigt keine pathologischen Veränderungen im Lungengewebe und es kommt zu keiner alveolären Leukozytose (modifiziert durch veränderte Beschriftung nach Hackstein et al.2012 [87]). Dargestellt sind pulmonale Histopathologische Schnittbilder von Imiquimod und Placebo behandelten Tieren nach einer HE-Färbung (A). Alveolär (A.I) und bronchial (A.II) sind keine Pathologien nach 7 tägiger Aldara® Exposition zu erkennen. Die absoluten intraalveolären CD45⁺ Leukozyten wurden nach einem Tag und nach sieben Tagen mittels BAL untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Zellzahl (B). Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung, n≥3.

4. Diskussion

4.1. Veränderung der respiratorischen Leukozyten ohne Zeichen einer pulmonalen Entzündung nach TLR-7 Hautstimulation

In dieser Arbeit wurde anhand eines Placebo kontrollierten Tierversuchs die Modulation respiratorischer Leukozyten Subpopulationen nach lokaler Applikation des TLR-7 Liganden Imiquimod analysiert. Bisher wurden Veränderungen nach TLR-7 Stimulation vor allem im Blut und lymphatischen Gewebe untersucht, jedoch noch nicht die Modulation der respiratorischen Leukozyten nach TLR-7 Hautstimulation. Gunzer und Kollegen untersuchten vor allem das Blut nach systemischer Gabe von R-848 während zum Beispiel bei Baenzinger und Kollegen das lymphatische Gewebe im Focus stand [9,10].

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Modulation der respiratorischen Leukozyten durch TLR-7 Hautstimulation möglich ist und dabei keine Zeichen einer pulmonalen Entzündung nachzuweisen waren. Dies konnte durch eine normale Leukozytenzahl in der BAL sowie durch den nicht pathologischen Befund der Lunge belegt werden. Die absoluten und relativen respiratorischen DCs und respiratorischen NK Zellen stiegen nach TLR-7 Hautstimulation beachtlich an, währenddessen von den Lymphozyten die respiratorischen B-Zellen sanken. Die meisten Veränderungen wurden schon 24 Stunden nach TLR-7 Hautstimulation beobachtet und der Effekt verstärkte sich nach einer Behandlung von über 7 Tagen. Durch die mitgeführte Placebogruppe konnten diese Modulationen der respiratorischen Leukozyten eindeutig auf die Imiquimod Applikation zurück geführt werden, da es bei den Mäusen der Kontrollgruppe zu keinen Veränderungen der Immunzellen gekommen ist. Des Weiteren wurde durch TLR-7 Hautstimulation die Zytokinproduktion der respiratorischen Leukozyten moduliert. Es kommt dadurch zu einer Verringerung von IFN- γ , TNF α und zu einem Anstieg von IL-10. Diese Modulation hat eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem.

4.2. Neue Methode zur Beeinflussung des Immunstatus der Lunge: Stimulation des TLR-7 über die Haut

Für Medikamente ist die Lunge im Vergleich zur Haut nicht direkt zugänglich. Die pulmonalen therapeutischen Ansätze basieren vor allem auf Inhalation. Imiquimod (Aldara®) wird topisch bei Patienten mit Condylomata acuminata, oberflächliche Basalzellkarzinome und aktinische Keratosen erfolgreich angewandt [7]. In einer Studie von Tying und Kollegen konnte bei Patienten mit Condylomata acuminata eine lokale (Warzen Biopsie) Reduktion der viralen DNA und eine vermehrte Bildung von TNF α und IFN- γ m-RNA nach Hautstimulation nachgewiesen werden [76]. Eine andere Verabreichungsform des TLR-7 Agonisten ist die systemische Gabe (intraperitoneal), die vor allem zur Analyse von Blut, Milz und dem Lymphsystem in Studien benutzt wurde [9,10]. Für die Modulation des pulmonalen Immunstatus wurde Aldara von Xirakia und Kollegen intranasal verabreicht [4]. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Modulation der Leukozyten in der Lunge verwendet, die lokale Applikation von Imiquimod auf die Haut. Diese Methode ermöglicht eine einfache Anwendung ohne invasive Verfahren. Das Medikament wird nicht direkt in den Organismus injiziert, dadurch sinkt zusätzlich das Risiko von Nebenwirkungen. Den Mäusen wurde nach dem Entfernen des Rückenhaars die Aldara® Creme auf die Haut aufgetragen. Dadurch wurde verhindert, dass die Tiere das Medikament oral durch Ablecken aufnehmen. Zusätzlich wurden sie einzeln in isoliert belüfteten keimfreien Käfigen gehalten. Diese Maßnahmen verhinderten Infektionen durch pathogene Keime, die zu einem verfälschten Ergebnis bei der Analyse der Leukozyten geführt hätten. Die Einzelhaltung verhinderte zusätzlich auch das Ablecken der Substanz durch Begleittiere.

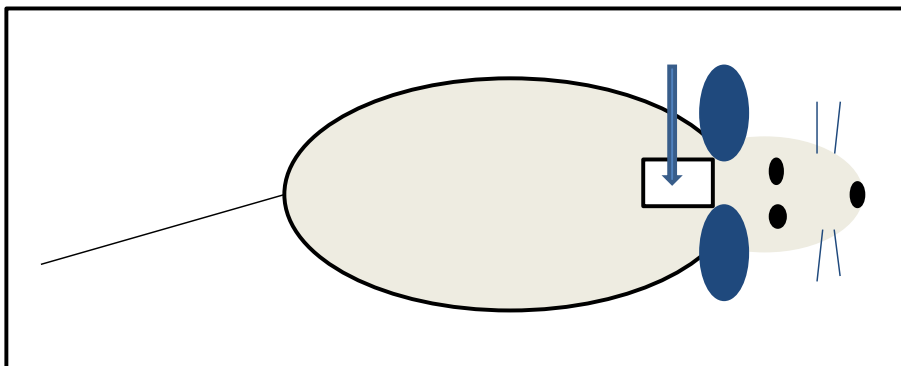


Abbildung 19: Dargestellt ist der Applikationsort von Imiquimod auf der Black 6 Maus (eigene Graphik). Ein Areal auf dem Rücken (in der Nähe des Kopfes) wurde frei rasiert und für das Auftragen des TLR-7 Agonisten Imiquimod benutzt. Das Ablecken des Medikaments war somit für die Maus nicht möglich.

4.3. Bestätigung und Vertiefung von vorangegangenen TLR-7 Applikations Studien

4.3.1. *Systemische und topische Applikation von TLR-7 erzielt ähnliche Veränderungen im Blut*

Die einmalige systemische Gabe von dem TLR-7 Liganden R-848 führt im Blut zu einer vorübergehenden Leukozytopenie, in der die Immunzellen durch erhöhte Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen aus dem Gefäßsystem in die peripheren Organe wandern [10]. Das Absinken der Leukozyten konnte im Blut ebenfalls nach TLR-7 Hautstimulation beobachtet werden. Die zirkulierenden B-Zellen, T-Zellen und Monozyten verringerten sich nach 24 Stunden Behandlung. Diese Zellen scheinen nach TLR-7 Hautstimulation vorübergehend in Organe abzuwandern und dort den Immunstatus zu ändern. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die NK Zellen und DCs im Blut untersucht. Sie stiegen nach einmaliger Behandlung mit Imiquimod an. NK Zellen repräsentieren die unspezifische Abwehr und DC Zellen verknüpfen das angeborene und adaptive Immunsystem. Ein Anstieg im Blut könnte darauf zurückzuführen sein, dass TLR-7 die Migration über CCR7 fördert und die Aktivität der DCs über die MyD88 Kaskade steigt [22]. Dies könnte in weiteren Studien erforscht werden. NK Zellen können durch eine Kombination aus TLR-7 und Zytokin (IL-12; IFN- α) Stimulation aktiviert werden und im Blut infizierte Zellen aufsuchen und töten [68]. DCs, vor allem pDCs, sind IFN- α Produzent und könnten über dieses Zytokin NK Zellen aktivieren.

4.3.2. *Keine Zeichen einer pulmonalen Destruktion im Vergleich zum lymphatischen Gewebe*

Baenzinger und Kollegen berichteten, dass eine tägliche intraperitoneale Injektion über 7 Tage von dem TLR-7 Liganden R-848 zu einer Zerstörung der lymphoiden Struktur und zu Zeichen einer chronischen Entzündung im lymphatischen System führt [9]. Daraufhin wurde in dieser Arbeit das pulmonale Kompartiment auf Entzündungszeichen nach 7 tägiger Hautstimulation mit 0,6mg Imiquimod untersucht. In der Histopathologie der Lunge konnten keine Anzeichen einer Inflammation beobachtet werden. Da die Zellzahl der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage ebenfalls nach 7 Tagen im normalen Bereich war, kann man davon ausgehen, dass die TLR-7 Hautstimulation zu keiner chronischen Lungenentzündung führt. Es kommt primär zu einer Veränderung der Zusammensetzung der respiratorischen Leukozyten und zu einer Modulation der Zytokinproduktion durch Imiquimod Hautstimulation. Die

maximale Dosis bei Baenzinger ist 1mg/Kg pro Tag. Bei einer 30g schweren Maus wären das 0,03mg Imiquimod. Durch Haut Applikation werden weniger als 1% resorbiert, das bedeutet bei einer maximal Dosis von 0,6mg wären das <0,006mg Imiquimod (Fachinformation, MEDA Pharma GmbH & Co.KG). Somit wird deutlich weniger Imiquimod systemisch aufgenommen als durch intraperitoneale Injektionen. Die verschiedenen Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Dosierungen zurückführen. Eine geringere Dosis Imiquimod scheint keine Inflammation im pulmonalen Gewebe auszulösen. Ebenfalls könnte die Applikationsform eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Reaktionen sein.

4.3.3. Zusammensetzung der respiratorischen Leukozyten wird verändert nach Imiquimod Behandlung

Nach einer Studie, in der intranasal der TLR-7 Ligand R-848 appliziert wurde, kam es zu einer Ansammlung von NK Zellen, Granulozyten sowie plasmazytoiden und myeloiden DCs in der Lunge [4]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die respiratorischen Leukozyten sich nicht nur ansammeln, sondern durch Imiquimod in ihrer Zusammensetzung moduliert werden. Besonders deutlich wird das bei der Modulation von den respiratorischen DC Subtypen durch den TLR-7 Liganden. Die pulmonalen MoDCs und CD11b^{high} DCs steigen nach Hautstimulation an. Die MoDCs entwickeln sich aus zirkulierenden Monozyten, die in die Lunge abwandern und dort residieren (Abbildung 20.A). Lombardi und Kollegen zeigten in vitro dass die Monozyten nach R-848 und LPS Inkubation IL-10 produzieren und über Treg Zellen TH1 und TH2 Zellen hemmen [77]. Des Weiteren besitzen die respiratorischen MoDCs nach einer Studie von Nakano und Kollegen keine CCR7 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche für die Migration und Antigenpräsentation in den Lymphknoten unerlässlich sind [78]. Diese Studien lassen sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit verknüpfen. Denn nach TLR-7 Hautstimulation kommt es zu einem Anstieg der MoDCs in der Lunge, welcher aber nicht zu entzündlichen pathologischen Veränderungen des pulmonalen Gewebes führt. Die CD103⁺ DCs konnten mittels Influenza Virus Infektion von Kim und Kollegen als primäre antigenpräsentierende Zelle in den ersten Lymphknoten des pulmonal abfließenden Lymphsystem identifiziert werden [60]. In dieser Arbeit kam es zum Absinken dieser pulmonalen DC Subpopulation. Für die Verringerung der respiratorischen CD103⁺ DCs nach TLR-7 Hautstimulation könnte somit die Migration dieser DC Subpopulation dafür verantwortlich sein (Abbildung 20.B). Die respiratorischen pDCs neigen dagegen nach längerer Stimulation mit Imiquimod zu

einem leichten Anstieg. Die pDCs haben die Fähigkeit die Einwanderung von Monozyten in die Lunge zu hemmen und dadurch eine verstärkte Entzündungsreaktion zu verhindern [38]. Dies würde die Theorie, dass TLR-7 Hautstimulation nicht zu einer pulmonalen Entzündung führt, unterstützen. Die pDCs besitzen einen großen Anteil an TLR-7 Rezeptoren. Deshalb wurde in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass sie eine besondere Rolle in der TLR-7 Hautstimulation spielen. Dies bestätigte sich in den Ergebnissen leider nicht. Die TLR-7 Hautstimulation scheint keinen großen Einfluss auf die respiratorischen pDCs zu haben, obwohl sie in größeren Mengen Träger des TLR-7 Rezeptors sind. Deshalb sind die beobachteten Veränderungen wahrscheinlich die sekundäre Folge einer TLR-7 bedingten Immunstimulation.

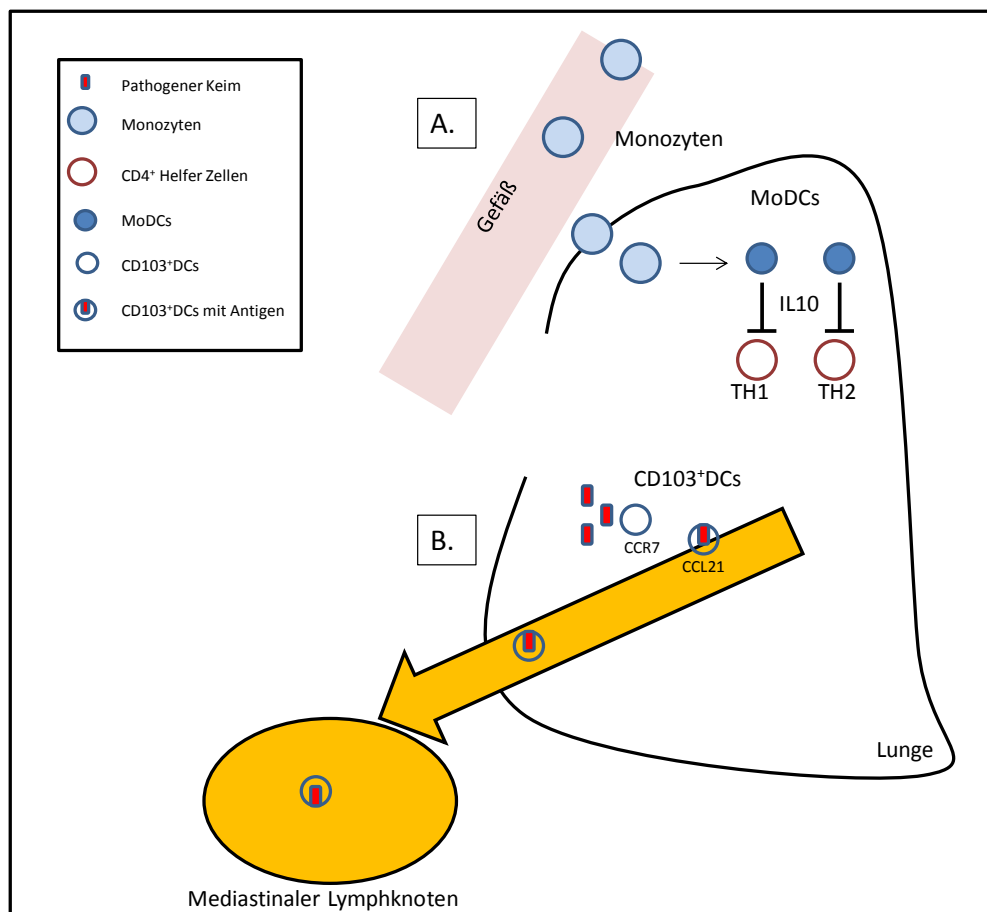


Abbildung 20: Die Lunge und die Aufgabe der pulmunalen MoDCs und CD103⁺DCs (eigene Graphik).

(A.) Dargestellt ist die Einwanderung der Monozyten in die Lunge, sowie deren Umwandlung in MoDCs. Als MoDCs schütten sie vermehrt IL-10 aus und hemmen so TH1 und TH2 Zellen. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Immunantwort (T-Helferzellen aktivieren nicht das adaptive Immunsystem). (B.) Die CD103⁺DCs nehmen Antigene auf und folgen dem CCR7 Liganden CCL21 in das abfließende Lymphgefäß, wo sie dann in den mediastinalen Lymphknoten wandern.

Neben den DCs wurden auch andere Leukozytenpopulationen in Ihrer Anzahl moduliert. Hart und Kollegen zeigten in vitro, dass NK Zellen durch Stimulation mit R-848 aktiviert werden und IFN- γ produziert wird [68]. Diese Studie über NK Zellen in vitro konnte in dieser Arbeit an dem Mausmodell unterstützt werden. Die TLR-7 Hautstimulation führte nach 7 tägiger Behandlung zu einem absoluten und relativen Anstieg der respiratorischen NK Zellen. Die Aktivierung dieser Zellen scheint nicht nur direkt, sondern auch mit Unterstützung von Helferzellen (DCs; Monozyten) abzulaufen (Abbildung 21). Der Anstieg der NK Zellen könnte mit dem Anstieg der DCs assoziiert sein. Trotz der Zunahme der respiratorischen NK Zellen nach TLR-7 Hautstimulation konnte keine pulmonale Entzündung nachgewiesen werden. Konträr ist auch das das respiratorische IFN- γ nach TLR-7 Hautstimulation nicht ansteigt, obwohl NK Zellen dieses Zytokin vermehrt sezernieren können.

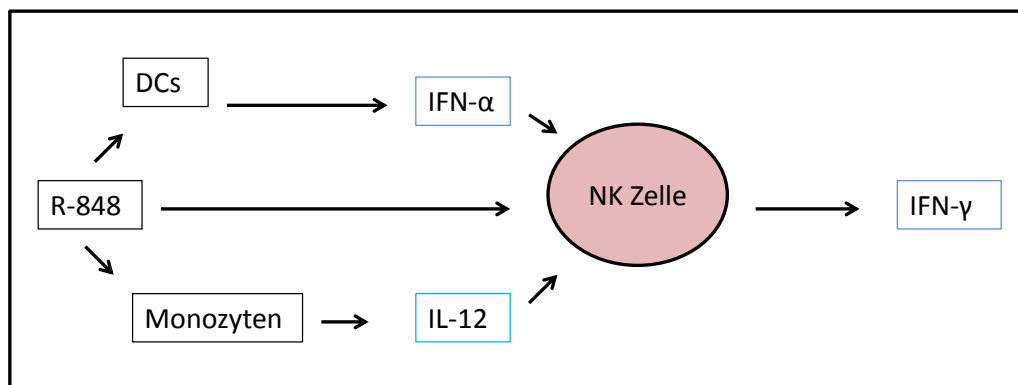


Abbildung 21: Direkte und indirekte NK Zellen Aktivierung durch den TLR-7 Liganden R-848 in vitro (eigene Graphik mit Informationen aus Hart et al.2005 [68]).

Die respiratorischen Lymphozyten werden ebenfalls durch Hautstimulation mit Imiquimod beeinflusst. Die respiratorischen B-Zellen verringern sich absolut und relativ nach TLR-7 Hautstimulation. Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zu einer in vitro Studie, bei der es durch Imiquimod Stimulation zu einer Proliferation von B-Zellen gekommen ist [79]. Es scheint, dass in vivo durch TLR-7 Stimulation eine Kaskade ausgelöst wird, bei der verschiedene Zellen über Zytokine miteinander interagieren und bei der es dadurch zu einer Verringerung der B-Zellen in der Lunge kommt. Diese Theorie wird durch die Studie am Mausmodell von Baenzinger unterstützt, bei der es durch intraperitoneale Injektion von R-848 ebenfalls nicht zu einem Anstieg, sondern zu einer Reduktion der B Zellen im Blut kommt [9].

4.3.4. Veränderung der Zytokinproduktion in der Lunge sowie im Blut nach TLR-7 Stimulation unterstützt die Theorie der systemischen Immunmodulation durch TLR-7 Hautstimulation

Die Modulation von Leukozyten ist auch durch Zytokine geprägt. Sie können Zellen hemmen oder aktivieren. Verschiedene Zellpopulationen produzieren unterschiedliche Zytokine. Dies ist unter anderem abhängig von der Art der Rezeptoren, die auf der Zelle verankert sind. Die Aktivierung des TLR-7 führt über den MyD88 Signalweg zur Transkription von Genabschnitten, die vor allem Zytokine kodieren [62]. Als Transkriptionsfaktor sind zum Beispiel NFκB und IRF7 bekannt. Der Transkriptionsfaktor NFκB kontrolliert über 60 Gene, die bei Entzündungen das Immunsystem modulieren [80]. Er steuert über den TLR-7 Signalweg IL-12, IL-6 und TNFα, während über IRF7 das antivirale Protein IFN-α transkribiert wird [62,63]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch TLR-7 Hautstimulation mit Imiquimod zu einer Modulation der Zytokinproduktion durch respiratorische Leukozyten kommt. Die Veränderung war schon bei geringer Dosis (0,12mg/d) zu beobachten. Interessanterweise wurden gleichzeitig die respiratorischen Leukozytenzahlen durch Imiquimod gar nicht, beziehungsweise nur gering verändert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Modulation der respiratorischen Zytokinproduktion bei einer geringen Dosis früher registriert wird als die Veränderung der respiratorischen Leukozytenzahlen. Die Modulation der respiratorischen Zytokine spricht für eine systemische Immunmodulation durch TLR-7 Hautstimulation. Eine Studie von Xiong und Kollegen unterstützt die Theorie der systemischen Modulation, denn dort konnte nach längerer TLR-7 Hautstimulation die Überlebenszeit von Mäusen mit intrakraniellen Tumoren verbessert werden [81].

Die respiratorischen Leukozyten produzierten nach 7 Tagen Hautstimulation mit 0,12mg Imiquimod signifikant weniger IFN-γ und den TNFα im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese beiden Zytokine wirken aktivierend auf Immunzellen. Ihre verringerte Sezernierung im pulmonalen Kompartiment spricht ebenfalls gegen eine Entzündung der Lunge nach TLR-7 Hautstimulation. Unterstützt wird diese Vermutung durch das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10. Das IL-10 wird in Mäusen nach 7 tägiger Behandlung mit Imiquimod vermehrt von den respiratorischen Leukozyten sezerniert. Dieses Zytokin hemmt eine zu starke Immunreaktion durch Immunmodulation der Leukozyten. Dies konnte schon bei Mäusen, die keinen IL-10 Rezeptor besitzen, gezeigt werden [82]. Die verringerte Ausschüttung von IFN-γ und TNFα, sowie die vermehrte Sezernierung von IL-10 nach 7 tägiger Hautstimulation mit Imiquimod, spricht für die Modulation des Immunsystems mit einer pulmonalen

Zytokinsituation, die eine Hemmung des Immunsystems durch langfristige TLR-7 Stimulation unterstützt.

Interessanterweise verhalten sich die Zytokine IL-10 und $\text{TNF}\alpha$ unterschiedlich in Bezug auf eine einmalige und eine längerfristiger Behandlung mit 0,12mg Imiquimod und anschließender Stimulation mit LPS. IL-10 wird in Bezug auf die Kontrollgruppe nach einmaliger Behandlung weniger sezerniert und nach 7 tägiger Behandlung vermehrt von den respiratorischen Leukozyten produziert. $\text{TNF}\alpha$ verhält sich gegensätzlich dazu, denn nach einem Tag konnte ein Anstieg und nach 7 Tagen ein Abfall diese Zytokins beobachtet werden. Dieses Ergebnis ähnelt denen von Baenzinger und Kollegen, die nach einmaliger intraperitonealer Injektion von R-848 einen Anstieg von $\text{TNF}\alpha$ im Blut nach 90 Minuten und einen Abfall nach 3 Tagen registriert haben [9]. Diese Veränderungen könnten für 2 verschiedene Modulationen durch TLR-7 Hautstimulation sprechen. Eine sofortige Modulation der respiratorischen Leukozyten und eine längerfristige Veränderung des Immunstatus der Lunge.

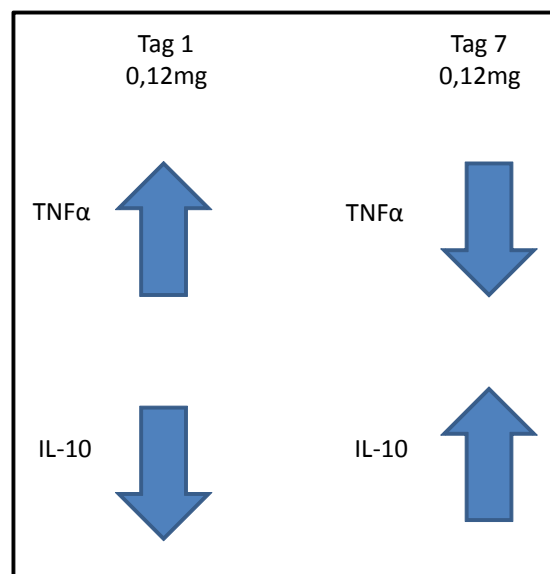


Abbildung 22: Veränderte Zytokinproduktion durch respiratorische Leukozyten nach TLR-7 Hautstimulation und LPS Inkubation (eigene Graphik).

Nach einmaliger Gabe von 0,12mg Imiquimod wird vermehrt $\text{TNF}\alpha$ von den respiratorischen Leukozyten produziert und weniger IL-10 sezerniert. Nach 7 Tagen Behandlung mit 0,12mg Imiquimod wird weniger $\text{TNF}\alpha$ und mehr IL-10 produziert.

4.3.4.1. Zusammenspiel von pulmonalen Leukozyten und Zytokinen nach 7 Tagen Behandlung mit 0,12mg Imiquimod Hautstimulation

Der stimulierte TLR-7 aktiviert die MyD88 Signalkaskade und es werden durch NFκB vor allem proinflammatorische Zytokine produziert, wie TNFα, IL-12, IL-6. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls nach Imiquimod Behandlung zu Veränderungen von IL-10 und IFN-γ kommt. Diese beiden Zytokine werden nicht direkt über den TLR-7-MyD88-NFκB Signalweg produziert, sondern eher über ein Zusammenspiel von verschiedenen respiratorischen Leukozyten und Zytokinen. Durch Imiquimod Hautstimulation sinkt IFN-γ und TNFα. Dafür könnte das antientzündliche Zytokin IL-10 verantwortlich sein. Es hemmt Immunzellen und verhindert die Sezernierung von Zytokinen die eine Entzündung fördern [82]. Für den genauen Ablauf der molekularen Mechanismen müssten in der Zukunft weitere Experimente durchgeführt werden. In einer Studie von Clausen und Kollegen konnte an einem Mausmodell mit lokaler Hypersensitivität gezeigt werden, dass IL-10 in der Haut DCs moduliert und zu starke Reaktionen verhindert [83]. Es lassen sich Parallelen zwischen der Studie von Clausen und dieser Arbeit ziehen. Nach TLR-7 Hautstimulation steigt IL-10 in der Lunge an und es sind keine Zeichen einer pulmonalen Entzündung nachweisbar. Die respiratorischen DCs könnten, genau wie in der Haut, durch IL-10 moduliert werden und infolge dessen wahrscheinlich einen Immunstatus herstellen, der eine zu starke Antwort des Immunsystems unterdrückt.

4.4. Experimentelle Verwendung einer hohen Dosis Imiquimod im Vergleich zu klinischen Anwendungen

Die verwendete Dosis von Imiquimod in diesem Experiment ist deutlich höher als bei den klinischen Anwendungen. Die maximale Tagesdosis bei der Behandlung der Aktinischen Keratose ist ein Beutel Aldara®, dieser enthält 12,5mg Imiquimod (Beipackzettel, MEDA Pharma GmbH & Co.KG). Die Maximale Behandlungsdauer darf 8 Wochen nicht überschreiten. Die Mäuse in dieser Studie wurden mit einer maximalen Tagesdosis von 0,6mg Imiquimod behandelt. Das durchschnittliche Gewicht der *Black* 6 Mäuse war 25g, setzt man die in ein Verhältnis mit einem 70Kg schweren Menschen, wurde den Tieren die 20 fache Dosis auf die Rückenhaut aufgetragen. Das wirft die Frage auf, ob beim Menschen diese Menge ohne schädliche Folge appliziert werden kann und ob es bei kleineren Mengen ebenfalls zu Modulationen durch Hautstimulation kommt. In einer Studie, bei der eine hohe Dosis Imiquimod (62,5mg Imiquimod/5 Beutel) über einen längeren Zeitraum auf die Haut von gesunden Menschen

aufgetragen wurde, konnte eine Veränderung der Leukozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe im Blut beobachtet werden [84]. Dieses Ergebnis von Pasmazi unterstützt die Hypothese, dass es systemisch nach TLR-7 Hautstimulation zu einer Modulation der Leukozytenzahl kommt.

4.5. Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit konnte in vivo die Modulation respiratorischer Leukozyten durch TLR-7 Hautstimulation mittels Imiquimod aufgezeigt werden. Dadurch wurde eine neue Applikationsmethode etabliert für eine Beeinflussung des pulmonalen Immunstatus. Ebenfalls erleichtert die neu eingeführte 8 Farb Durchflusszytometrie und die *gating* Strategie der Immunzellen zukünftige Experimente, die sich mit respiratorischen DC Subpopulationen befassen.

Auf die Ergebnisse dieser Studie sollten weitere Experimente aufbauen, die die molekularen Mechanismen entschlüsseln, welche zu Immunmodulationen der respiratorischen Leukozyten durch TLR-7 Hautstimulation führen. Ein Ansatzpunkt wäre die Studie von Suzuki, bei der es durch die lokale Applikation von Imiquimod zu einer vermehrten Abwanderung der Langerhanszellen zu den drainierenden Lymphknoten kam [85]. Des Weiteren könnte an einem Maus-Pneumonie-Modell die Auswirkung von Imiquimod vor der Entzündung, während der Entzündung und nach der Entzündung untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die Frage, ob durch eine lokale Applikation des TLR-7 Agonisten Imiquimod (Aldara®) auf die Haut eine Modulation der pulmonalen Leukozyten möglich ist. An einer Placebo-Kontrollierten Studie am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch TLR-7 Hautstimulation eine Modulation der respiratorischen DCs, der B-Zellen sowie der NK Zellen möglich ist. Dabei war die Modulation der DC Subpopulationen von besonderem Interesse. Hier konnte aufgezeigt werden, dass die respiratorischen MoDCs absolut und relativ nach 7 Tagen Behandlung mit 0,6mg Imiquimod signifikant ansteigen. Des Weiteren wurden die pulmonalen Zytokine untersucht. Auch hier zeigten sich einige Veränderungen der Zytokinproduktion durch respiratorische Leukozyten. Trotz Modulation der pulmonalen Leukozyten und Zytokine konnten keine Zeichen einer Entzündung in der Lunge aufgezeigt werden. Die pulmonale histopathologische Untersuchung nach TLR-7 Hautstimulation war unauffällig. Es waren keine Leukozyteninfiltrate oder eine Verdickung der Alveolarsepten zu sehen. Ergänzt wurde die Untersuchung durch eine BAL. Dort konnten keine Veränderungen der respiratorischen Leukozytenzahlen nach Imiquimod Behandlung nachgewiesen werden. Die lokale Applikation mit dem TLR-7 Agonisten Imiquimod (Aldara®) ist eine neue Methode respiratorische Leukozyten zu modulieren und dadurch eventuell eine zu starke Immunantwort zu hemmen. Das Besondere an dieser Methode ist die nicht invasive Verabreichungsform.

6. Summary

In this work the main question to be answered was, if a topical treatment with the TLR-7 ligand imiquimod (Aldara®) would modulate respiratory leukocytes. In a placebo-controlled animal study a modulation of respiratory DCs, B-cells and NK cells was shown after Imiquimod treatment. The main interest was focused to the DC subsets in the lung. This work shows that after 7 days of treatment with 0,6mg imiquimod the MoDCs significantly increased. On the other hand we analysed the cytokines. After local treatment with TLR-7 ligand the respiratory cytokine production capacity was modulated. Even after the modulation of leukocytes and cytokines after imiquimod treatment no sign of lung inflammation was detected. This was shown by pulmonary histopathology and no elevation of leukocytes in the bronchoalveolar lavage. So this work shows that skin TLR-7 triggering may represent a new non-invasion method to modulate respiratory leukocytes and immune responses.

7. Abkürzungen

AG	Antigen
ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CD	Cluster of differentiation
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotid
DCs	Dendritische Zellen
DML	Drainierende Mediastinale Lymphknoten
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FLT3	FMS like tyrosine kinase 3
FSC	Forward scatter
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen colony-stimulating factor
HCV	Hepatitis C Virus
HEV	High endothelial venules
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
imDC	Imature Dendritische Zellen
IRAK	IL1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatory Factor
ISG	Interferon-stimulated gene
IVC	Individually Ventilated Cages
JNK	Jun Kinase
LHZ	Langerhanszellen
LPS	Lipopolysacharid
LRR	Leucine rich repeats

MACS	Magnetic cell separation
MAPK	Mitogen activated Kinase
MHC	Major Histocompatibility complex
MLN	Mediastinale Lymphknoten
MoDC	Monocytaire Dendritische Zellen
Mph	Makrophagen
mRNA	Message RNA
MUC1	Mucine like Glykoprotein
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NG	Neutrophile Granulozyten
NK	Natürliche Killer Zellen
NO	Sickstoffmonoxid
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PKR	RNA-dependent protein kinase
PMT	Photomultiple Tubes
R-848	Resiquimod
RDC	Respiratorische Dendritische Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Respirationstrakt
SP-A	Surfactant Protein A
SPF	Spezifiziert pathogen frei
SSC	Side scatter
ssRNA	Singel stranded RNA
TAB	TAK1 bindendes Protein
TAK	TGF β aktivierte Kinase 1
TCR	T cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TH	T-Helfer Zellen
TIR	Toll/Interleukin Rezeptor
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR	Toll like Rezeptor

TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRAF6	TNFR-assoziiertes Faktor 6
Treg	Regulatorische T Zellen
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tzyt	Zytotoxische T Zellen
WHO	World health Organization

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung der DCs aus haemopoetischen Stammzellen.....	4
Abbildung 2: Die Immunologische Homeostase im unteren Respirationstrakt.	10
Abbildung 3: Aktivierungsmechanismus und Signalkaskade des TLR-7 Rezeptors.	13
Abbildung 4: Die Molekulare Struktur von Imiquimod 1-(2-methylpropyl)-1H- imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine	14
Abbildung 5: Graphische Darstellung für Zellpopulationen durch die Punktwolke und Kontourplot	25
Abbildung 6: Darstellung wie das FITC Emissionsspektrum sich mit dem PE Signal überlappt.....	26
Abbildung 7: Ablauf des Sandwich ELISA.	29
Abbildung 8: Dargestellt ist die Gate-Strategie für die Subpopulationen der DCs und Mph.	32
Abbildung 9: Hautstimulation mit Imiquimod erhöhte die absolute und relative Zellzahl der respiratorischen Dendritischen Zellen.....	34
Abbildung 10: Anhäufung von respiratorischen DCs nach TLR-7 Hautstimulation wird durch einen Anstieg von monozytären DCs und CD11b ^{high} DCs verursacht.....	36
Abbildung 11: Lymphozyten <i>gating</i> -Strategie durch spezifische Oberflächenmarker.....	38
Abbildung 12: Verringerung der respiratorischen B und T- Zellpopulation nach Hautstimulation mit Imiquimod.....	39
Abbildung 13: Anstieg der respiratorischen NK-Zellen nach 7 tägiger Hautstimulation mit Imiquimod.....	40
Abbildung 14: TLR-7 Hautstimulation beeinflusst die respiratorischen TCR γ/δ T-Zellen (A) und regulatorische T-Zellen (B (CD3 ⁺ CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Zellen)) nur im geringen Ausmaß.....	41
Abbildung 15: Dargestellt ist die Gate-Strategie für TCR γ/δ T-Zellen (A), regulatorisch T-Zellen (B) und NK Zellen (C).	42

Abbildung 16:TLR-7 Hautstimulation verändert die respiratorische Zytokinproduktion.	44
Abbildung 17: Veränderung der respiratorischen Leukozyten Subpopulationen sind verknüpft mit Verschiebungen der gleichen Subpopulationen im Blut nach TLR-7 Stimulation.	46
Abbildung 18: TLR-7 Hautstimulation zeigt keine pathologischen Veränderungen im Lungengewebe und es kommt zu keiner alveolären Leukozytose.	48
Abbildung 19: Dargestellt ist der Applikationsort von Imiquimod auf der Black 6 Maus.	50
Abbildung 20: Die Lunge und die Aufgabe der pulmonalen MoDCs und CD103 ⁺ DCs	53
Abbildung 21: Direkte und indirekte NK Zellen Aktivierung durch den TLR-7 Liganden R-848 in vitro.....	54
Abbildung 22: Veränderte Zytokinproduktion durch respiratorische Leukozyten nach TLR-7 Hautsimulation und LPS Inkubation.....	56

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Murine DC Subpopulationen, Prozentuale Aufteilung im lymphatischen Gewebe.....	5
Tabelle 2: Pulmonale DC <i>Subsets</i>	7
Tabelle 3: Aldara Applikationsdosis	21
Tabelle 4: Lungenverdauung.....	22
Tabelle 5: Fluorochromkombinationen für die Farbmarkierung der Zellen.	22
Tabelle 6: MACS-Puffer.....	28

10. Literaturverzeichnis

- [1] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.
- [2] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16:3–9.
- [3] Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2004;25:381–6.
- [4] Xirakia C, Koltsida O, Stavropoulos A, Thanassopoulou A, Aidinis V, Sideras P et al. Toll-like receptor 7-triggered immune response in the lung mediates acute and long-lasting suppression of experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1207–16.
- [5] Kim T, Braciale T. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS One* 2009;4:e4204.
- [6] Diebold S, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529–31.
- [7] A Gaspari A, Tying SK, Rosen T. Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy. *J Drugs Dermatol* 2009;8:467–74.
- [8] O'Neill L, Bryant C, Doyle S. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev* 2009;61:177–97.
- [9] Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC et al. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 2008;113:377–88.
- [10] Gunzer M, Riemann H, Basoglu Y, Hillmer A, Weishaupt C, Balkow S et al. Systemic administration of a TLR7 ligand leads to transient immune incompetence due to peripheral-blood leukocyte depletion. *Blood* 2005;106:2424–32.

- [11] Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001;106:259–62.
- [12] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J* 2011;52:379–92.
- [13] Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, Manie S, Le Deist F, Azocar O et al. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:1753–60.
- [14] Lipscomb M, Masten B. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82:97–130.
- [15] Shortman K, Liu Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151–61.
- [16] Hoyne GF, Tan K, Corsin-Jimenez M, Wahl K, Stewart M, Howie SE et al. Immunological tolerance to inhaled antigen. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S169-74.
- [17] Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 2001;22:41–7.
- [18] Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:582–90.
- [19] Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000;192:1775–84.
- [20] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621–67.
- [21] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 2001;59:124–30.

- [22] MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Uguccioni M, Lipp M, Lanzavecchia A et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003;198:615–21.
- [23] Murphy K, Reiner S. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:933–44.
- [24] Szabo S, Sullivan B, Peng S, Glimcher L. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003;21:713–58.
- [25] Maldonado-Lopez R, Smedt T de, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 1999;189:587–92.
- [26] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291–5.
- [27] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835–7.
- [28] Boo K, Yang J. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei Med J* 2010;51:9–17.
- [29] Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 2005;174:1932–7.
- [30] Robert C, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Ayehunie S, Hynes RO, Cheng G et al. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* 1999;189:627–36.
- [31] Hammad H, Lambrecht BN. Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol* 2007;93:265–78.
- [32] von G, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas J, Strickland D et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 2005;175:1609–18.

- [33] Beaty S, Rose C, Sung S. Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 2007;178:1882–95.
- [34] Le B, Etchart N, Goubier A, Lira S, Sirard J, van R et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 2006;24:191–201.
- [35] Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 2007;26:519–31.
- [36] Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, Gunn MD. CCR2⁺ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J Immunol* 2008;180:2562–72.
- [37] Maus U, Grote K von, Kuziel WA, Mack M, Miller EJ, Cihak J et al. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:268–73.
- [38] Venet F, Huang X, Chung C, Chen Y, Ayala A. Plasmacytoid dendritic cells control lung inflammation and monocyte recruitment in indirect acute lung injury in mice. *Am J Pathol* 2010;176:764–73.
- [39] Heer HJ de, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MAM et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004;200:89–98.
- [40] Diacovo T, Blasius A, Mak T, Cella M, Colonna M. Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 2005;202:687–96.
- [41] Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A et al. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med* 2005;202:425–35.
- [42] Ruuskanen O, Lahti E, Jennings L, Murdoch D. Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264–75.

- [43] Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J* 2001;18:692–704.
- [44] Daltro P, Santos E, Gasparetto T, Ucar M, Marchiori E. Pulmonary infections. *Pediatr Radiol* 2011;41 Suppl 1:S69-82.
- [45] Snelgrove R, Godlee A, Hussell T. Airway immune homeostasis and implications for influenza-induced inflammation. *Trends Immunol* 2011;32:328–34.
- [46] Sano H, Kuronuma K, Kudo K, Mitsuzawa H, Sato M, Murakami S et al. Regulation of inflammation and bacterial clearance by lung collectins. *Respirology* 2006;11 Suppl:S46-50.
- [47] Bleck B, Tse D, Jaspers I, Curotto d, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol* 2006;176:7431–7.
- [48] Roth MD, Golub SH. Human pulmonary macrophages utilize prostaglandins and transforming growth factor beta 1 to suppress lymphocyte activation. *J Leukoc Biol* 1993;53:366–71.
- [49] Jia H, Kline J, Penisten A, Apicella M, Gioannini T, Weiss J et al. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L428-37.
- [50] Hussell T, Goulding J. Structured regulation of inflammation during respiratory viral infection. *Lancet Infect Dis* 2010;10:360–6.
- [51] Small C, Shaler C, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, Brown E et al. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *J Immunol* 2010;184:2048–56.
- [52] Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 2008;205:323–9.

- [53] Meijvis SC, Grutters JC, Thijsen SF, Rijkers GT, Biesma DH, Endeman H. Therapy in pneumonia: what is beyond antibiotics? *Neth J Med* 2011;69:21–6.
- [54] Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:393–416.
- [55] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973–83.
- [56] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–7.
- [57] Hedayat M, Netea M, Rezaei N. Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2011;11:702–12.
- [58] Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg A, Wagner H et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499.
- [59] Desnues B, Macedo AB, Roussel-Queval A, Bonnardel J, Henri S, Demaria O et al. TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:1497–502.
- [60] Kim Y, Brinkmann MM, Paquet M, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008;452:234–8.
- [61] Saitoh S, Miyake K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev* 2009;227:32–43.
- [62] Blasius A, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010;32:305–15.
- [63] Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15136–41.

- [64] Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434:243–9.
- [65] Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K et al. Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195:1507–12.
- [66] Dzopalic T, Dragicevic A, Vasilijic S, Vucevic D, Majstorovic I, Bozic B et al. Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1428–33.
- [67] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987–95.
- [68] Hart O, Athie-Morales V, O'Connor G, Gardiner C. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN- γ production. *J Immunol* 2005;175:1636–42.
- [69] Lee MS, Kim Y. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007;76:447–80.
- [70] Browne E. Toll-like Receptor 7 Controls the Anti-Retroviral Germinal Center Response. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002293.
- [71] Bernstein DI, Harrison CJ. Effects of the immunomodulating agent R837 on acute and latent herpes simplex virus type 2 infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1511–5.
- [72] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196–200.
- [73] Harrison L, Skinner S, Marbury T, Owens M, Kurup S, McKane S et al. Pharmacokinetics and safety of imiquimod 5% cream in the treatment of actinic keratoses of the face, scalp, or hands and arms. *Arch Dermatol Res* 2004;296:6–11.

- [74] Berghofer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN- α production in females. *J Immunol* 2006;177:2088–96.
- [75] Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 2002;48:1819–27.
- [76] Tyring SK, Arany I, Stanley MA, Tomai MA, Miller RL, Smith MH et al. A randomized, controlled, molecular study of condylomata acuminata clearance during treatment with imiquimod. *J Infect Dis* 1998;178:551–5.
- [77] Lombardi V, van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN- γ , and IL-17A by naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2009;182:3372–9.
- [78] Nakano H, Burgents JE, Nakano K, Whitehead GS, Cheong C, Bortner CD et al. Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol* 2013;6:678–91.
- [79] Tomai MA, Imbertson LM, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol* 2000;203:55–65.
- [80] Baeuerle PA. I κ B-NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 1998;95:729–31.
- [81] Xiong Z, Ohlfest JR. Topical imiquimod has therapeutic and immunomodulatory effects against intracranial tumors. *J Immunother* 2011;34:264–9.
- [82] Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–74.
- [83] Clausen BE, Girard-Madoux MJH. IL-10 control of dendritic cells in the skin. *Oncoimmunology* 2013;2:e23186.
- [84] Pasmuzzi E, Chaidaroglou A, Sakkis T, Monastirli A, Georgiou S, Sagriotis A et al. Topical application of imiquimod induces alterations in peripheral blood lymphocytes in healthy individuals. *Acta Derm Venereol* 2009;89:134–9.

- [85] Suzuki H, Wang B, Shivji GM, Toto P, Amerio P, Tomai MA et al. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 2000;114:135–41.
- [86] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13:816-25.
- [87] Holger Hackstein, Nicole Hagel, Angela Knoche, Sabine Kranz, Jürgen Lohmeyer, Werner von Wulffen, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Gregor Bein, Nelli Baal. Skin TLR7 Triggering Promotes Accumulation of Respiratory Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *PLoS One* 2012;7(8):e43320.
- [88] Ce Shi, Zhengming Xiong, Padmaja Cittepu, Courtney C Aldrich, John R. Ohlfest, David M. Ferguson. Discovery of Imidazoquinolines with Toll-Like Receptor 7/8 Independent Cytokine Induction. *ACS Med Chem Lett* 2012; 3(6): 501-504.

Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen

10.1. Originalarbeiten

Holger Hackstein, Nicole Hagel, Angela Knoche, Sabine Kranz, Jürgen Lohmeyer, Werner von Wulffen, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Gregor Bein, Nelli Baal. (2012) Skin TLR7 Triggering Promotes Accumulation of Respiratory Dendritic Cells and Natural Killer Cells.

PLoS One 7(8): e43320. doi: 10.1371/journal.pone.0043320

10.2. Abstract/Poster

Nelli Baal, Nicole Hagel, Angela Knoche, Werner von Wulffen*, Gregor Bein, and Holger Hackstein. Marked modulation of pulmonary dendritic cell subsets after topic skin treatment with the TLR7 agonist imiquimod (2010). ECCPS Bad Nauheim.

Holger Hackstein, Nicole Hagel, Werner von Wulffen, Olivia Kershaw, Achim Gruber, Gregor Bein, Nelli Baal. Skin triggering of TLR7 modulates respiratory dendritic cells and natural killer cells – identification of a novel mode for manipulation of respiratory leukocytes (2012). DZL symposium Marburg.

11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, das dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Magdeburg, 12. Juni 2014

Unterschrift

12. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hackstein für die Überlassung des interessanten Themas, für die Unterstützung und den hilfreichen Hinweisen während der Zeit der Experimente sowie beim Schreiben der Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen bedanken. Besonderen Dank an Nelli Baal, die oft stundenlang die aufwändigen Experimente mit mir durchgeführt hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Eltern sowie Großeltern bedanken, die mich in jeglichen Belangen immer unterstützt haben. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden bedanken, insbesondere Tina Saas und Franziska Mäge. Abschließend möchte ich mich bei meiner kleinen Familie bedanken, meinem Partner Dominik Dietze und meiner Tochter Romy.